Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen zur Antigenstruktur von Sproßpilzen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi
für das Fach
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn

—

vorgelegt von

Hanne-Lene Müller

Marburg a. d. Lahn

1967

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert

Untersuchungen zur Antigenstruktur von Sproßpilzen

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi
für das Fach
Medizinische Mikrobiologie und Immunologie
der Hohen Medizinischen Fakultät der
Philipps-Universität zu Marburg a. d. Lahn

vorgelegt von

Hanne-Lene Müller

Marburg a. d. Lahn

1967

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
I. Bedeutung der Sproßpilze als Krankheitserreger	1
II. Diagnostik der Sproßpilze	2
III. Serologie der Sproßpilze	3
B. Methodik	6
I. Herkunft der Stämme	6
II. Züchtung der Stämme	7
III. Trennung von Zellwänden und Zellinhalt	7
IV. Gewinnung der Antiseren	8
V. Serologische Reaktionen	8
a) Komplementbindungsreaktion	8
b) Präzipitation	8
c) Agglutination	8
d) Hämagglutination	8
VI. Absorptionsversuche	9
a) Absorption mit intakten Zellen	9
b) Absorption mit isolierten Zellwänden	9
c) Absorption mit sensibilisierten Erythrozyten	9
VII. Antigenextraktionen	10
a) Phenol/Wasser-Extraktion	10
b) Antigenextraktion durch Kochen	10
c) Antigenextraktion durch Kalilauge	10
d) Ammonsulfat-Fällung	11
VIII. Elektrophorese und Immunelektrophorese im Agar-Gel	11
IX. Säulenchromatographie	12
C. Ergebnisse	13
I. Immunologische Untersuchungen an getrenntem Zellmaterial von C. albicans und C. tropicalis	13
a) Komplementbindungsreaktion, Zellagglutination und Präzipitation	13

Seite

b) Agar- und immunelektrophoretische Untersuchungen an getrenntem Zellmaterial von C. albicans und C. tropicalis 17

II. Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Sproßpilzarten 22

a) Antigene Beziehungen der Candida-Arten untereinander 22

b) Antigene Beziehungen anderer Sproßpilzarten untereinander 25

c) Antigene Beziehungen der Candida-Arten zu anderen Hefen 27

1. Kreuzreaktionen von Candida-Antiseren mit anderen Hefeantigenen 27

2. Kreuzreaktionen von Candida-Antigenen mit Seren gegen andere Hefearten 28

III. Absorptionsversuche mit getrenntem Zellmaterial von C. albicans und C. tropicalis 31

IV. Versuche zur Isolierung von Antigenen 35

a) Gewinnung von serologisch aktiven Polysacchariden durch verschiedene Extraktionsverfahren 35

b) Trennung der Polysaccharide durch Gelfiltration 36

c) Auftrennung der Polysaccharide durch Ammonsulfatbehandlung 43

d) Gewinnung von Eiweißfraktionen 44

V. Kreuzreaktionen zwischen isolierten Fraktionen und Antiseren gegen heterologe Sproßpilze 48

a) Polysaccharidfraktionen nach Phenol/Wasser-Extraktion 48

b) Eiweißfraktionen nach $(NH_4)_2SO_4$-Behandlung 51

c) Antigene des Überstandes nach 90%iger Ammonsulfatbehandlung 53

VI. Immunisierungsversuche mit den durch Ammonsulfatfällungen gewonnenen Fraktionen aus fünf Sproßpilzen 55

Seite

VII. Kreuzreaktionen zwischen den Seren, die gegen die Niederschläge nach 90%iger Ammonsulfatsättigung aus dem Zellinhalt von fünf Candidaarten gewonnen wurden, und heterologen Sproßpilzhomogenisaten 55

D. Besprechung 58

I. Antigene der Sproßpilze und ihre Lokalisation 58

II. Chemie der Sproßpilze und ihrer Antigene 61

III. Antigenschema der Sproßpilze 65

IV. Praktische Bedeutung der Befunde 68

E. Zusammenfassung 70

F. Literatur

A. EINLEITUNG

I. Bedeutung der Sproßpilze als Krankheitserreger

Die Sproßpilze haben in den letzten Jahrzehnten als Erreger endogener Mykosen erheblich an Bedeutung gewonnen. Während primäre Mykosen durch hefeartige Pilze, mit Ausnahme der Hautmykosen, relativ selten vorkommen, haben sich die sekundären Mykosen vor allem seit Einführung der antibiotischen Therapie erheblich vermehrt. Eine bedeutende Stellung unter den Erregern der Pilzkrankheiten nimmt - insbesondere in Europa - die fakultativ-pathogene Sproßpilzgruppe CANDIDA ein. Unter dem Begriff "Genus Candida" faßt man heute fermentierende und nicht fermentierende Hefen zusammen, die Pseudomycel (und teilweise auch echtes Mycel) bilden, bei denen aber keine Askosporenbildung nachweisbar ist. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß diese Einteilung phylogenetisch nicht gerechtfertigt ist. So hat man inzwischen zu einigen Candidaarten perfekte, also sporenbildende Formen gefunden (s. WINDISCH 1960), die mit anderen Hefearten identisch sind, wie zum Beispiel:

Candida pseudotropicalis	-	Saccharomyces fragilis
Candida macedoniensis	-	Saccharomyces marxianus
Candida robusta	-	Saccharomyces cerevisiae
Candida krusei	-	Pichia fermentans

Für eine neue Gliederung liegen jedoch noch nicht genügend Untersuchungen vor.

Diese hefeartigen Erreger, die bei Gesunden als Saprophyten auf der Haut und Schleimhaut vorkommen (TANNER, LAMPERT, E.N. und LAMPERT, M. 1927, KLOSE und SCHÜRMANN 1952, ROBINSON 1954, WINDISCH und STAIB 1955, BERNHARDT 1960, SCHABINSKY 1960 u.a.), können unter besonderen Bedingungen akute, subakute und chronische Infektionskrankheiten auslösen. Als prädisponierende

Faktoren gelten Tuberkulose, Karzinom, Diabetes, Ernährungsstörungen bei Säuglingen, Gravidität, Störungen der normalen Bakterienflora, z.B. durch Antibiotikabehandlung oder bei Hautmykosen durch dauernde Wassereinwirkung, wie sie bei einigen Berufen gegeben ist. Die klinische Symptomatik variiert in weiten Grenzen. Grundsätzlich lassen sich nach SCHABINSKY (1960) vier Erscheinungsformen unterscheiden: die broncho-pulmonale Form, die Hautmykosen, die Schleimhauterkrankungen und die selteneren Verlaufsformen, wie Organ-Mykosen, generalisierte Mykosen und Sepsis.

Der häufigste Erreger dieser Gattung ist Candida albicans, jedoch keinesfalls der pathogenste Vertreter, wie nicht selten irrtümlich behauptet wird. Zahlreiche Veröffentlichungen beweisen, daß auch C. tropicalis (SIMONS 1954, DROUHET et VIEU 1956, RÖTTER und STAIB 1958, CONN u. Mitarb. 1959, SCHABINSKY 1960, POLEMANN 1961, STAIB und BRAUN 1961, BADER 1965), C. krusei (WOLFE and HENDERSON 1951, DROUHET et VIEU 1956, SIMONS 1954, STAIB und ATA 1957, VITEZ u. Mitarb. 1957, SCHABINSKY 1960, POLEMANN 1961, BADER 1965), C. guilliermondii (ZIMMERMANN 1950, KÖHLMEIER 1953, NIEL 1953, SIMONS 1954, SCHABINSKY 1960, POLEMANN 1961), C. pseudotropicalis (SIMONS 1954, SKOBEL u. Mitarb. 1955, DROUHET et VIEU 1956, SCHABINSKY 1960, POLEMANN 1961, BADER 1965), C. parapsilosis (JOACHIM and POLAYES 1940, PASTERNACK 1942, WIKLER u. Mitarb. 1942, SIMONS 1954, PERSELLIN u. Mitarb. 1961, POLEMANN 1961, SCHOLER 1963) u.a. Mykosen verursachen können. Eine Differenzierung der Hefen ist deshalb schon allein aus diagnostischem Interesse wünschenswert.

II. Diagnostik der Sproßpilze

Neben der allerdings nicht ausreichenden morphologischen Beurteilung erfolgt die Klassifizierung der Sproßpilze mit biochemischen Methoden, die hauptsächlich auf der Fermentierung und Assimilierung verschiedener Substrate beruhen. Diese Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Zeit und Material. Es hat deshalb nicht an Versuchen gefehlt, Schnellmethoden zu entwickeln. Sie beruhen einerseits auf besonderen Wachstumsformen

oder Selektion einzelner Hefearten auf bestimmten Nährböden (WELD 1952, KAFFKA 1956, FAHLBERG u. Mitarb. 1957, MEHNERT 1962 u.a.), andererseits auf der Chlamydosporenbildung von C. albicans (NICKERSON et MARKOWITZ 1953, BAKERSPIEGEL 1954, PAVLATOU et MARCELOU 1956, KELLY und FUNIGIELLO 1959, JULEY u. Mitarb. 1962, MÜLLER u. Mitarb. 1967 u.a.). Diese Methoden können allerdings nur zur vorläufigen Diagnostizierung herangezogen werden, jedoch nicht die exakte biochemische Differenzierung ersetzen.

Wegen des saprophytären Vorkommens der Sproßpilze auf Haut und Schleimhaut ist eine Aussage, ob eine aus dem Untersuchungsmaterial angezüchtete Hefe am Krankheitsgeschehen beteiligt ist, sehr schwierig. Deshalb sollte stets der Antikörpernachweis zur Beurteilung der Befunde herangezogen werden, der anzeigt, ob eine Auseinandersetzung mit dem Makroorganismus stattgefunden hat.

III. Serologie der Sproßpilze

Der durch Pilze und ihre Stoffwechselprodukte gesetzte antigene Reiz wird, ebenso wie bei Infektionen durch Bakterien, Protozoen und Viren, vom Wirtsorganismus immunbiologisch beantwortet. Diese Auseinandersetzung äußert sich einerseits in der Bildung humoraler Antikörper, andererseits in einer Gewebsumstimmung, die zur Überempfindlichkeit führt. Bei den Pilzinfektionen ist die Allergisierung häufig deutlicher ausgeprägt als die sehr träge ablaufende Antikörperproduktion. Deshalb wird dem Intracutantest mehr Bedeutung als dem Antikörpernachweis beigemessen. Ein weiterer Nachteil ist die Uneinheitlichkeit der Untersuchungstechnik bei der Antikörpersuche. Es werden nicht nur unterschiedliche Methoden, sondern auch verschiedene Antigenaufbereitungen verwendet. Erschwerend für die Beurteilung der Befunde ist aber auch die Tatsache, daß normalerweise schon bei Gesunden Antikörpertiter gegen Candida vorkommen (TODT 1937, TOMSIKOVA und WAGNER 1949, POSPISIL 1954, SEELIGER 1962, SCHABINSKY 1960, MÜLLER 1967). Schließlich treten zahlreiche Kreuzreaktionen der Sproßpilze untereinander und sogar mit anderen Mikroorganismen auf. Diese Schwierigkeiten bei der Antikörper-

suche, welche die Pilzserologie in Mißkredit gebracht haben, lassen sich erst beseitigen, wenn die Antigenstruktur der Sproßpilze geklärt ist. Erst dann können die für eine Art spezifischen Antigene gewonnen, und die serologischen Untersuchungsmethoden standardisiert werden.

Über die Pilzantigene liegen bereits zahlreiche Untersuchungen vor, deren Ergebnisse sich aber zum Teil widersprechen oder wegen ihrer unterschiedlichen Methodik nicht miteinander vergleichbar sind. Das erste Antigenschema stammt von MARTIN (1937, 1942), der bei 4 Candida-Arten drei Antigenfaktoren in mengenmäßiger Verschiedenheit angibt:

C. albicans	X	4Y	3Z
C. stellatoidea	X	2Y	2Z
C. tropicalis	X	4Y	
C. parapsilosis	X		4Z

POSPISIL (1959), der mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion und Zellagglutination Antigenuntersuchungen an 5 Candida-Arten vornahm, kommt dagegen schon zu differenzierteren Ergebnissen:

C. albicans	a,1,2,3,4
C. tropicalis	b,1,2,3,4
C. pseudotropicalis	c,1,5
C. krusei	d,1,2,4
C. guilliermondii	e,1,2,3,5

Die Buchstaben sollen die spezifischen, die Zahlen die in mehreren Hefearten vorkommenden Antigene kennzeichnen. Einen großen Fortschritt brachten die Untersuchungen von TSUCHIYA (1954-1965). In Anlehnung an das Antigenschema der Salmonellen von KAUFMANN und WHITE absorbierte er Antiseren, die durch Immunisierung mit Candida-Arten gewonnen waren, mit heterologen Sproßpilzen. Sein erstes Antigenschema, das später auf weitere Hefearten ausgedehnt wurde, lautet:

C. albicans	1,2,3,4,5,6,7	
C. tropicalis	1,2,3,4,5,6	
C. pseudotropicalis	1,8	a
C. krusei	1,2,5	b

C. parakrusei	1,2,3,5	c
C. guilliermondii	1,2,3,4,9	
C. stellatoidea	1,2,3,4,5	

Die Zahlen bedeuten thermostabile, die Buchstaben thermolabile Antigene. Aufgrund seiner Methode (Immunisierung und Absorption mit intakten Hefezellen) konnte er allerdings nur die Zellwandantigene erfassen. Sie reichen zur Aufstellung von Antigenschemata nicht aus, wie Untersuchungen von BIGUET (1962) zeigen. Dieser stellte bei Verwendung von zertrümmertem Zellmaterial zur Immunisierung und zum Nachweis der Antikörper weit mehr Antigene in der Immunelektrophorese fest. Seine Antigenformel für 7 Candida-Arten lautet:

C. albicans	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15
C. stellatoidea	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12, (15-16)
C. tropicalis	1,2,3,4,5,6,7,17,18,19,20,21,22
C. zeylanoides	1,2,3,4,5,17,23,24,25,26,27,28,29
C. krusei	2,3,30,31,32,33,34,35,36,37,38
C. pseudotropicalis	1,30,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48
C. macedoniensis	1,30,39,40,41,42,43,44,45,46

Jedes Antigenschema wurde also mit einer anderen Methode gewonnen, so daß die abweichenden Ergebnisse verständlich sind. Wir wollen deshalb am Beispiel einiger Hefen die verschiedenen, heute in der Serologie üblichen Untersuchungsverfahren miteinander vergleichen und auf ihre Empfindlichkeit prüfen. Mit der geeignetsten Methode soll dann eine Auswahl von Sproßpilzen verschiedener Gattungen auf ihre Antigengemeinschaften untersucht werden. Vor allem soll festgestellt werden, ob es für die einzelnen Gattungen spezifische Antigengruppen gibt und somit die Serologie der Hefen einen Beitrag zu einer neuen Einordnung der Candida-Arten in die anderen Hefegattungen bringen kann.

Es soll ferner versucht werden, aus der Menge der Antigene einzelne zu isolieren, um zu gruppen- oder monospezifischen Seren zu kommen.

B. METHODIK

I. Herkunft der Stämme

Species:	Herkunft:
Candida albicans 256	CBS*
Candida tropicalis 94	CBS
Candida pseudotropicalis	CBS
Candida utilis 840	CBS
Candida stellatoidea	CBS
Candida curvata	Hygiene-Institut Würzburg**
Candida krusei	CBS
Candida guilliermondii	Hygiene-Institut Würzburg
Candida reukaufii S 56-192	Hygiene-Institut Würzburg
Candida brumptii	Hygiene-Institut Würzburg
Candida lipolytica	Hygiene-Institut Würzburg
Candida parapsilosis	Dermatologische Klinik Marburg***
Candida scottii CBS 2300	Hygiene-Institut Würzburg
Candida macedoniensis S 37-81	Hygiene-Institut Würzburg
Candida robusta	CBS
Saccharomyces cerevisiae	CBS
Saccharomyces rouxii	CBS
Torulopsis dattila	Dermatologische Klinik Marburg
Torulopsis glabrata 5311	Hygiene-Institut Würzburg
Torulopsis famata 935	Hygiene-Institut Würzburg
Torulopsis inconspicua S 181-315	Hygiene-Institut Würzburg
Schizosaccharomyces octosporus	CBS
Cryptococcus neoformans	Hygiene-Institut Würzburg
Rhodotorula mucilaginosa	Dermatologische Klinik Marburg

---

* CBS = Centralbureau voor Schimmelcultures, Delft

Für die Überlassung von Stämmen danke ich den Herren:

** Professor Dr. SEELIGER, Direktor des Instituts für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität Würzburg

*** Professor Dr. BRAUN-FALCO, Direktor der Dermatologischen Klinik der Universität Marburg/L.

II. Züchtung der Stämme

Die auf Sabouraud-Maltose-Agar (Difco) in Roux-Schalen nach Vorkultur ausgeimpften Stämme wurden 48 Std. bei 30°C bebrütet. Hierauf erfolgte die Abschwemmung der Hefezellrasen mit physiol. NaCl-Lösung. Die Suspensionen wurden zentrifugiert, und die Sedimente dreimal mit NaCl-Lösung gewaschen.

III. Trennung von Zellwänden und Zellinhalt

Die Zellen wurden in einer etwa 50 vol%igen Suspension 4 Min. mit Glaskugeln (0,5 mm Ø) im Zellhomogenisator MSK (Firma Braun, Melsungen) bei ca. 4000 UpM unter Kühlung mit Kohlensäureschnee homogenisiert. Dabei platzten - wie mikroskopisch kontrolliert - alle Zellwände, so daß der Zellinhalt austreten konnte (siehe Abbildung 1). Durch Zentrifugieren des Homogenisats (15 min. bei ca. 2700 UpM, Christ-Zentrifuge Typ UJ3) wurden die Zellwände abgeschleudert und von dem überstehenden Inhalt getrennt. Das noch an den Zellwänden haftende Inhaltsmaterial wurde durch wiederholtes Zentrifugieren (ca. 20 - 30x) weitgehend ausgewaschen. Beide getrennte Zellmaterialien stellen Antigengemische dar.

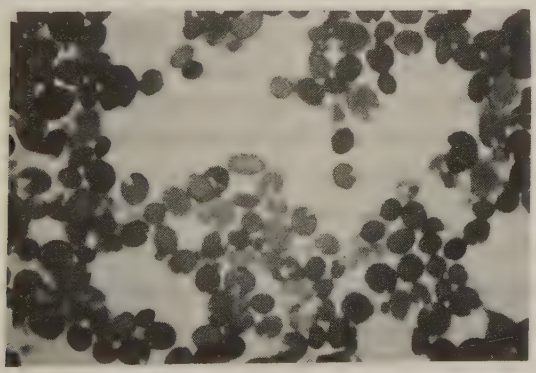


Abbildung 1: Gewaschene Zellwände nach PAS-Färbung.

IV. Gewinnung der Antiseren

Homogenisat, Zellwände, Zellinhalt oder Antigenextrakte wurden unerhitzt oder erhitzt (Erwärmung an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 Std. auf 60°C im Wasserbad oder 2 Std. auf 100°C) verwendet. Mit den einzelnen Fraktionen der jeweiligen Stämme wurden je 2 Kaninchen 3 Wochen lang nach folgendem Schema i.v. behandelt: in der 1. Woche täglich ansteigende Dosen von 0,5 ml bis 2,0 ml, in den nächsten beiden Wochen jeden 2. Tag 2,0 ml. Insgesamt erhielt jedes Tier, bezogen auf Trockengewicht, etwa 200 mg Rohantigen. Eine Woche nach der letzten Injektion erfolgten Probepunktionen. Erwies sich die Antikörperbildung als zu schwach, so wurden weitere Injektionen in 2-tägigem Abstand durchgeführt.

V. Serologische Reaktionen

a) Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde bei 37°C durchgeführt. Als Antigene dienten die gleichen Aufschwemmungen wie für die Immunisierung. Die Gebrauchsdosis (2 Antigeneinheiten) war vorher an einem Antiserum von bekanntem Titer eingestellt worden. Die geometrisch abgestuften Serumverdünnungsreihen (Faktor 2) begannen mit der Verdünnung 1 : 5.

b) Die Präzipitation wurde in Anlehnung an SEELIGER (1955) und OTTO (1960) als Agar-Gel-Präzipitationstest in einem 1,5%igen Wasseragar durchgeführt. Die Präzipitinogene waren mit den zur Immunisierung gewonnenen Fraktionen identisch.

c) Die Agglutination erfolgte im Objektträger-Test mit einem dreimal gewaschenen Zellsediment, das nicht älter als 48 Std. sein durfte, um Spontanagglutinationen zu vermeiden.

d) Hämagglutination: Um zu reproduzierbaren Ergebnissen zu gelangen, war es notwendig, die Antigene exakt einzustellen. Zu je 0,1 ml Erythrozytensediment vom Schaf wurden abgestufte Mengen serologisch aktiver Polysaccharide aus dem Zellinhalt von C. albicans oder C. tropicalis gegeben und mit dem homologen Antiserum zur Reaktion gebracht. Die doppelte Dosis der geringsten Antigenmenge, mit der gerade noch der

höchste Antikörpertiter erreicht wurde, diente zur Sensibilisierung der Blutkörperchen im Versuch. Die Antigeneinstellung wurde bei jeder neuen Antigencharge wiederholt. Durchschnittlich wurden 50 mg Substanz zur Beladung von 0,1 ml Erythrozytensediment benötigt. Diese Antigenmenge ließ sich erheblich reduzieren, wenn man dem Ansatz 0,25 ml 1%iger Papainlösung zusetzte.
Die Sensibilisierung der Schaferythrozyten erfolgte mit der ermittelten optimalen Antigenmenge für 2 Std. bei 37°C im Wasserbad. Nach dreimaligem niedertourigem Waschen des Blutkörperchensediments mit physiol. NaCl-Lösung wurde eine 1%ige Suspension hergestellt.
Die Prüfung des Antikörpergehalts der vorher mit unbehandelten Erythrozyten absorbierten Immunseren erfolgte in Verdünnungsreihen mit sensibilisierten Blutkörperchen (0,2 ml Serumverdünnung + 0,2 ml Erythrozytensuspension) auf Prestware-Hämagglutinationsplatten. Zur Kontrolle wurde die stärkste Serumkonzentration mit nicht sensibilisierten Blutkörperchen versetzt. Die Ablesung der Ergebnisse erfolgte nach einer Inkubationszeit von 2 Std. im Wasserbad bei 37°C und 18 Std. im Kühlschrank.

VI. Absorptionsversuche

a) Die Absorption mit intakten Zellen wurde mit gewaschenem Zellsediment vorgenommen. Je nach Antikörpergehalt der Seren kamen auf 1 Teil Serum 2 oder mehr Teile Hefezellsediment. Der Ansatz verblieb für 2 Std. bei 37°C im Wasserbad (mehrmaliges Aufschütteln des Sediments) und über Nacht im Kühlschrank, ehe das Zellsediment abzentrifugiert wurde.

b) Die Absorption mit isolierten Zellwänden geschah in gleicher Versuchsanordnung wie mit den intakten Zellen.

c) Zur Absorption mit sensibilisierten Erythrozyten mußten die Antiseren verdünnt werden, da die Absorptionskraft der sensibilisierten Blutkörperchen nur gering war. Für 1 ml einer Serumverdünnung 1 : 10 waren etwa 2 ml sensibilisierten Erythrozytensediments erforderlich. Die Sensibilisierung der Schafblutkörperchen erfolgte wie beim Hämagglutinationstest.

Die Absorptionszeit betrug, wie bei der Absorption mit intakten Zellen und Zellwänden, 2 Std. bei 37°C und über Nacht im Kühlschrank.

VII. Antigenextraktionen

a) Phenol/Wasser-Extraktion. Beim Kälteauszug wurden etwa 100 mg Material (Trockengewicht von Zellwänden bzw. Zellinhalt) in 40 ml auf + 2°C vorgekühltem Aqua dest. aufgeschwemmt und mit 66 ml ebenfalls gekühltem 70%igem Phenol versetzt. Die Gemische blieben unter ständigem Rühren auf einem Magnetrührer für 30 min. im Eiswasser. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert, die wäßrige Phase abgehoben und mit dem Rückstand die Prozedur wiederholt. Nach Vereinigung der beiden wäßrigen Phasen wurden sie 48 Std. gegen Wasser dialysiert, im Rotationsverdampfer bei 25°C auf etwa ein Drittel eingeengt und unter Zusatz von Na-acetat in der sechsfachen Menge Äthylalkohol gefällt. Die Phenolphase wurde verworfen, da sich in ihr keine antigene Wirksamkeit nachweisen ließ. - Der Wärmeauszug wurde nach dem gleichen Prinzip durchgeführt. Hier kamen auf 40 ml Suspension (Zellwand- bzw. -inhalt) 40 ml 90%iges Phenol bei 68°C unter ständigem Rühren zur Reaktion. Die nach Zentrifugieren gewonnene wäßrige Phase wurde ebenfalls in der sechsfachen Menge Alkohol gefällt.

b) Antigenextraktion durch Kochen. Die Zellwände bzw. der Zellinhalt der Sproßpilze wurde 2 Std. auf 100°C erhitzt. Nach Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile kam der Überstand in die sechsfache Menge Alkohol, dem gesättigte alkoholische Na-acetat-Lösung zugesetzt war. Der über Nacht im Kühlschrank entstandene Niederschlag wurde nach Zentrifugieren in Aqua dest. bzw. NaCl-Lösung gelöst. Ein Teil des Niederschlags blieb ungelöst und wurde verworfen.

c) Antigenextraktion durch Kalilauge. Die abzentrifugierten Zellwände wurden mit 1 m KOH, die Zellinhaltsuspension zu gleichen Teilen mit 2 m KOH versetzt und 30 min. mit einem Magnetrührer bei Zimmertemperatur gerührt. Aus dem nach Zentrifugieren gewonnenen Überstand mußte die KOH durch 48-stündige Dialyse gegen Wasser entfernt werden. Danach

ließ sich durch Zusatz der sechsfachen Menge Alkohol ein Niederschlag gewinnen, der in Wasser bzw. physiol. NaCl-Lösung löslich war.

d) Ammonsulfat-Fällung. Aus dem Zellinhalt der Hefen ließ sich durch 50%ige $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung ein geringer Niederschlag gewinnen, der nach Zentrifugation in physiol. NaCl-Lösung aufgenommen und gegen physiol. NaCl-Lösung dialysiert wurde. Der Überstand nach dieser Fällung wurde auf 90 % Ammonsulfat gebracht. Danach entstand nach 4 Std. Aufenthalt im Kühlschrank ein weiterer Niederschlag, der leicht in Wasser löslich war. Der Überstand wurde nach dieser zweiten Fällung durch Dialysieren vom Ammonsulfat befreit, im Rotationsverdampfer stark eingeengt und ebenfalls als Antigen verwendet.

VIII. Elektrophorese und Immunelektrophorese im Agar-Gel

Die Auftrennung der Antigene erfolgte mit Hilfe der Agarelektrophorese nach GORDON (1949) und URIEL (1955) mit dem Gerät der Firma LKB, Schweden. Als Puffer diente der von MICHAELIS angegebene Diaethylbarbitursäurepuffer mit einem pH-Wert von 8,2 und der Ionenstärke 0,1. Der als Medium dienende 1,2%ige Agar wurde aus 1,2 g "Difco" Agar Special-Noble mit 100 ml, 1 : 2 mit Wasser verdünnten Puffers hergestellt und im siedenden Wasserbad 15 min. erhitzt. Die Elektrophorese wurde 1 Std. bei 250 Volt (10 Volt/cm) durchgeführt. Nach 5 - 10-stündiger Fixierung mit Methanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis 9 : 1 : 5 und Lufttrocknung erfolgte die Färbung.

Die Immunelektrophorese wurde in Anlehnung an GRABAR und WILLIAMS, modifiziert nach SCHEIDEGGER (1955), ebenfalls in der LKB-Apparatur durchgeführt. Puffer und Herstellung der Agarplatten entsprachen der Agarelektrophorese. Nach 1-stündiger Elektrophorese bei 250 Volt und dem Auftragen des Immunserums dauerte die völlige Entwicklung der Präzipitationslinien in der feuchten Kammer, in Abhängigkeit von dem Antikörpergehalt des Serums, 12 - 36 Std.. Das nicht gebundene Eiweiß wurde durch 12 Std. langes Spülen der Objektträger in physiol. NaCl-Lösung entfernt.

Nach Lufttrocknung schloß sich die Färbung an. Im allgemeinen wurden die Präparate mit einer 0,5%igen Lösung von Amidoschwarz

10 B (Merck) in Methanol-Eisessig (9 : 1) gefärbt. Zur Auffindung von Polysacchariden bzw. Glykoproteinen erfolgte zusätzlich die PAS-Färbung mit einer 1%igen Perjodsäure-Lösung und 1%igem SCHIFFschem Reagens. In Einzelfällen durchgeführte Spezialfärbungen, verbunden mit besonderen Fixierungsmethoden, sind an entsprechender Stelle bei den Ergebnissen vermerkt.

IX. Säulenchromatographie

Auf Glassäulen von 50 cm Länge und 2,1 cm Durchmesser, die mit Wasser bzw. einem anderen Elutionsmittel gefüllt waren, kam ein Schütteltrichter mit dem entsprechenden Trägermaterial. Um ein gleichmäßiges Beschicken der Säulen zu erreichen, wurde das Trägermaterial mit Hilfe eines Rührmotors in ständiger Bewegung gehalten. Im gleichen Verhältnis, wie das Medium einfloß, wurde aus dem unteren Hahn der Säule das Wasser verdrängt und durch einen Schlauch abgeleitet. Das Ende des Schlauches wurde in der erwünschten Gelbetthöhe fixiert.

Sollte Sephadex als Säulenfüllung dienen, so mußte es 3 Tage vorher in entlüftetes Wasser zum Quellen gegeben werden, das nach Sedimentieren der Perlen mehrmals erneuert wurde.

Das Biogel neigte sehr zum Verklumpen. Es wurde deshalb vorsichtig durch ein feinmaschiges Perlonsieb in die abgemessene Wassermenge unter ständigem Rühren eingestreut.

Als Elutionsmittel diente im allgemeinen Wasser oder physiol. NaCl-Lösung.

C. ERGEBNISSE

I. Immunologische Untersuchungen an getrenntem Zellmaterial von C. albicans und C. tropicalis

a) Komplementbindungsreaktion, Zellagglutination und Präzipitation. Antiseren gegen Candidaarten wurden bisher durch Immunisierung von Kaninchen mit intakten Hefezellen, die durch Erhitzen oder mit Formol abgetötet waren, oder mit mechanisch zertrümmerten Zellen gewonnen. So war über die Lokalisation der Antigene nichts bekannt. Wir haben deshalb versucht, Antikörper gegen getrenntes Zellmaterial - zunächst von C. albicans und C. tropicalis (nicht erhitzt und auf 60°C erhitzt) - zu erzeugen. Zum Vergleich erhielten Kaninchen das Homogenisat. Die so gewonnenen Antiseren wurden mit der Komplementbindungsreaktion (KBR), der Zellagglutination und dem Präzipitationstest geprüft (SIEGERT, MÜLLER, PACHALY 1964).

In der Abbildung 2 sind die KBR-Titer mit homologen Antigenen dargestellt. Daraus geht hervor, daß sowohl die erhitzten als auch unerhitzten Zellwände beider Hefen zur Antikörperbildung führen. Ebenso induzierte der nicht erhitzte Zellinhalt von C. albicans Antikörper. Dagegen waren in den Seren der Tiere, die den auf 60°C erhitzten Inhalt von C. albicans erhalten hatten, mit verschiedensten Reaktionen keine Antikörper nachweisbar. Keine antigene Wirkung zeigte auch der erhitzte bzw. nicht erhitzte Inhalt von C. tropicalis. Diese Ergebnisse wurden an weiteren 5 Kaninchen bestätigt.

Die vergleichenden Untersuchungen zwischen den 3 Reaktionen - der Präzipitationstest wurde hier ausnahmsweise mit Extrakten aus dem Homogenisat nach BOIVIN und MESROBEANU (1934) durchgeführt - zeigten übereinstimmende Werte (Tabelle 1). Die einzige Ausnahme bestand darin, daß die Seren gegen den nicht erhitzten Zellinhalt von C. albicans mit der Agglutinationsreaktion einen wesentlich geringeren Titer als in der

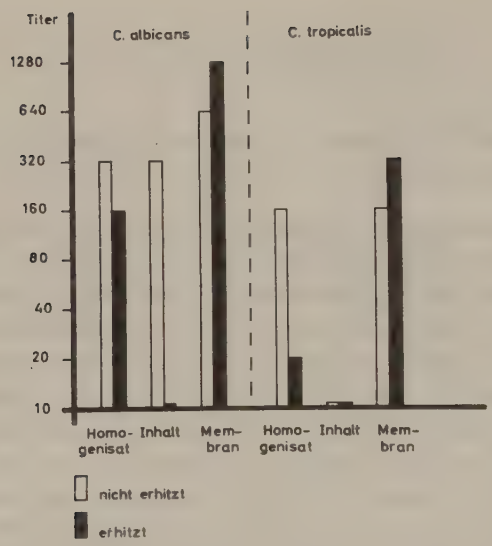


Abbildung 2: KBR-Titer mit homologen Antigenen
(nach SIEGERT, MÜLLER, PACHALY 1964)

KBR erreichten. Mit den gegen die erhitzten und nicht erhitzten Homogenisate, Zellwände und Zellinhalt von C. albicans und C. tropicalis gerichteten Seren wurden Kreuzreaktionen mit den verschiedenen Antigenen in der KBR durchgeführt. In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse zusammengefaßt. Daraus geht hervor, daß alle Fraktionen, erhitzt und nicht erhitzt, in vitro serologisch aktiv sind, d.h. also auch der Zellinhalt von C. tropicalis und der erhitzte Zellinhalt von C.albicans. Im allgemeinen reagierten die KBR-Antigene von C.albicans und C. tropicalis mit den homologen und heterologen Seren etwa gleichwertig.

Tabelle 1: KBR-, Agglutinationstiter und Präzipitation von Kaninchen-Antiseren.
Antigene: unbehandelte Homogenisate, Zellwände und Inhaltstoffe von C. albicans und C. tropicalis (Auszug nach SIEGERT, MÜLLER, PACHALY 1964)

Antiseren gegen			KBR	Aggl.	Präz.
C. albicans	Homo-genisat	a	320	512	++++
		b	160	256	++++
	Zell-inhalt	a	320	64	++++
		b	5	16	Ø
	Zell-wände	a	320	256	++++
		b	640	256	+++
C. tropicalis	Homo-genisat	a	40	64	+++
		b	80	128	+++
	Zell-inhalt	a	Ø	Ø	Ø
		b	Ø	Ø	Ø
	Zell-wände	a	320	320	++++
		b	160	160	++++

Zeichenerklärung:
a = nicht erhitzt
b = erhitzt
++++ = sehr starke Präzipitatbildung
+++ = starke Präzipitatbildung
++ = deutliche Präzipitatbildung
+ = schwache Präzipitatbildung
Ø = negative Reaktion

Tabelle 2: KBR-Titer von je 6 Seren gegen C. albicans und C. tropicalis.
Antigene: unbehandelte Homogenisate, Zellwände und Inhaltstoffe von C. albicans und C. tropicalis (Auszug nach SIEGERT, MÜLLER, PACHALY 1964)

Antiseren gegen			C.albicans-Antigene						C.tropicalis-Antigene					
			Homo-genisat		Zell-inhalt		Zell-wände		Homo-genisat		Zell-inhalt		Zell-wände	
			a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
C. albicans	Homo-genisat	a	320	320	320	320	1280	1280	320	320	640	640	320	320
		b	160	160	160	160	640	640	160	160	160	160	320	320
	Zell-inhalt	a	160	320	320	160	1280	640	160	160	160	160	320	320
		b	ø	ø	ø	ø	10	ø	ø	ø	ø	ø	5	ø
	Zell-wände	a	80	160	80	80	640	640	80	80	80	80	160	160
		b	640	640	640	320	1280	1280	640	640	640	1280	1280	640
C. tropicalis	Homo-genisat	a	40	40	80	40	1280	640	160	160	160	160	320	320
		b	20	40	20	10	160	80	20	20	20	20	40	40
	Zell-inhalt	a	ø	ø	ø	ø	5	ø	ø	ø	ø	ø	5	5
		b	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	ø	5	ø
	Zell-wände	a	160	160	160	320	320	320	160	160	160	160	160	160
		b	160	320	160	160	640	320	320	320	160	320	320	320

Zeichenerklärung: a = nicht erhitzt
b = erhitzt
ø = negative Reaktion

b) Agar- und immunelektrophoretische Untersuchungen an getrenntem Zellmaterial von C. albicans und C. tropicalis.

Bei Durchführung der Agarelektrophorese von homogenisierten Zellen der beiden Hefen trennten sich im elektrischen Feld zwei Substanzgruppen voneinander (Abbildung: 3a und 3b). Die eine zur Kathode wandernde Gruppe war schon nach der Fixierung im Methanol-Eisessig-Wasser-Gemisch sichtbar und teilte sich in zwei Fraktionen auf, die sich beide mit Perjodsäure-SCHIFFschem Reagens (PAS) anfärben ließen. Die andere Gruppe, die zur Anode wanderte, ließ sich nur durch Färbung mit Amidoschwarz darstellen (MÜLLER und HIRSCH 1967). Ein gleiches Verhalten fand sich bei der Elektrophorese des Inhalts beider Hefen. Auch hier stellte sich eine zur Anode wandernde Gruppe dar, die durch Amidoschwarzfärbung sichtbar wurde, sowie eine weitere, die zur Kathode wanderte und sich intensiv mit PAS färben ließ. Die Zellwände gaben keine elektrophoretisch wandernden Stoffe ab.

In der Immunelektrophorese bildeten die Homogenisate beider Hefen mit den gegen sie gerichteten Antiseren Präzipitationslinien sowohl zur Kathoden- als auch zur Anodenseite. Gleiche Bilder entstanden, wenn man den Zellinhalt beider Hefen mit den gegen die Homogenisate gerichteten Seren zur Reaktion brachte (Abbildung 4).

Die immunelektrophoretischen Diagramme der Antiseren gegen den Zellinhalt beider Sproßpilze zeigten sowohl mit den homogenisierten Zellen als auch mit den Materialien des Zellinhalts in der Hauptsache Präzipitate mit den zur Anode wandernden Substanzen. Erst nach Isolierung und Konzentrierung der Serumantikörper kamen auch Präzipitationslinien auf der Kathodenseite zur Darstellung.

Die gegen die Zellwände der beiden Sproßpilze gerichteten Antiseren ergaben mit den Homogenisaten und den Zellinhalten - auch nach Konzentrierung der Antikörper - nur Präzipitationslinien auf der Kathodenseite (siehe Abbildung 5).

Zur Prüfung der Thermolabilität der Antigene wurden das Homogenisat, der Zellinhalt sowie die Zellwände beider Hefen auf 60°C bzw. 100°C erhitzt. Die zur Kathode wandernden Substanzen zeigten selbst nach Erhitzung auf 100°C keine Veränderung, dagegen wurden die zur Anode wandernden Stoffe bei

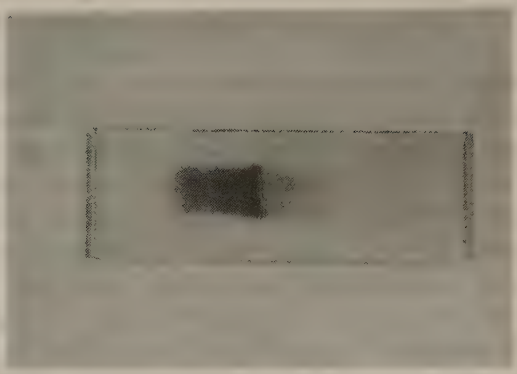


Abbildung 3a: Agarelektrophorese des Homogenisats von C. albicans nach Amidoschwarzfärbung.

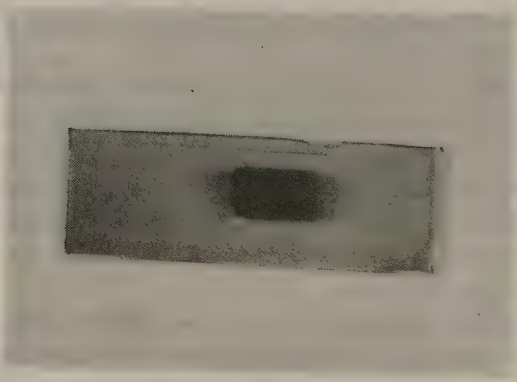
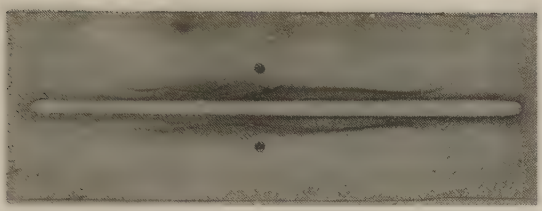


Abbildung 3b: Agarelektrophorese des Homogenisats von C. albicans nach PAS-Färbung.

a)



b)

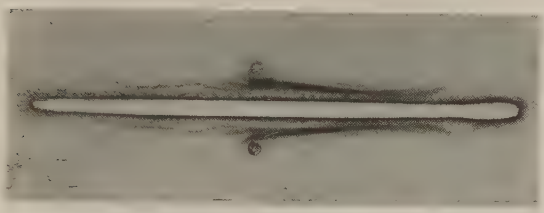


Abbildung 4: Immunelektrophoresen mit Seren gegen Homogenisat von C. albicans

a) oben: Homogenisat
unten: Zellinhalt von C. albicans

b) oben: Homogenisat
unten: Zellinhalt von C. tropicalis

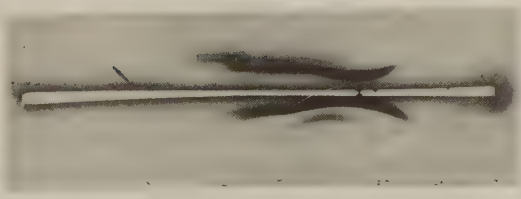


Abbildung 5: Immunelektrophoresen mit Antiserum gegen die Zellwände von C. albicans
oben: Homogenisat von C. albicans
unten: Homogenisat von C. tropicalis

dieser Temperatur vollständig denaturiert. Die Erwärmung auf 60°C wirkte sich unterschiedlich aus. Bei C. albicans stellten sich nur noch das am weitesten zur Anode wandernde Antigen und eines am Auftragspunkt dar, dagegen war der Anteil der thermostabilen Antigene bei C. tropicalis größer (siehe Abbildung 6).

a)

b)

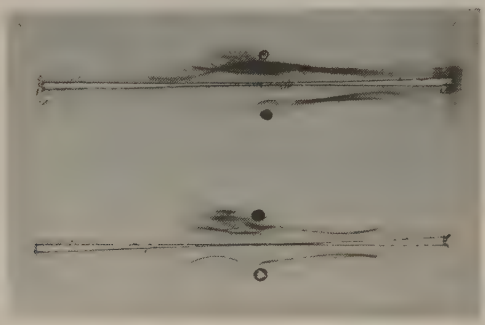


Abbildung 6: Immunelektrophoretischer Nachweis thermolabiler Antigene mit einem Serum gegen C. albicans-Homogenisat

a) oben: nicht erhitztes,
unten: erhitztes Homogenisat von C. albicans;

b) oben: nicht erhitztes,
unten: erhitztes Homogenisat von C. tropicalis.

Gleiche Präzipitationslinien entstanden, wenn der erhitzte Inhalt beider Hefen als Antigen aufgetragen wurde. Die Zellwände beider Sproßpilze gaben auch nach Erhitzung auf 100°C keine in der Immunelektrophorese erfaßbaren Substanzen ab. - Versuche mit Immunseren, die gegen erhitztes Homogenisat gewonnen waren, ergaben analoge Bilder. In jedem Fall waren die Antikörper gegen die zur Kathode wandernden Antigene voll nachweisbar, während einige Antikörper gegen die zur Anode wandernden Antigene nicht dargestellt wurden.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, daß sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden von C. albicans und C. tropicalis antigene Substanzen lokalisiert sind. Während die Zellwände nur eine zur Kathode wandernde Substanzgruppe besitzen, beinhaltet der Zellinhalt beider Hefen zwei unterschiedliche Stoffgruppen, von denen die eine zur Anode, die andere zur Kathode wandert. Die Wanderungsrichtung und die Spezialfärbungen weisen darauf hin, daß es sich bei den zur Kathode wandernden Fraktionen um Polysaccharide bzw. Glykoproteine, bei den zur Anode wandernden um eiweißhaltige Substanzen handelt.

Sowohl die Befunde der Komplementbindungsreaktion als auch der Immunelektrophorese deuten darauf hin, daß die im Zellinhalt und in den Zellwänden vorhandenen Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene identisch sind.

Während sich Unterschiede zwischen den Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigenen beider Hefen nicht eindeutig nachweisen lassen, sind neben gemeinsamen auch artspezifische Eiweißantigene in beiden Sproßpilzarten zu erkennen.

Der Vergleich der verschiedenen serologischen Methoden zeigt, daß die Immunelektrophorese die empfindlichste und exakteste Methode zum Nachweis aller Antigene ist.

II. Kreuzreaktionen zwischen verschiedenen Sproßpilzarten

Wie anfangs erwähnt, bestehen infolge partieller Antigengemeinschaften Kreuzreaktionen zwischen phylogenetisch nahe verwandten, aber auch zwischen heterologen Pilzarten. Die umfangreichsten Untersuchungen über die Antigenstruktur stammen von TSUCHIYA (1965), jedoch gilt sein Antigenschema - methodisch bedingt - nur für die Zellwandantigene.

Da sich die Eiweißantigene des Zellinhalts, wie im vorangegangenen Kapitel gezeigt, nur mit Hilfe immunelektrophoretischer Untersuchungen an zertrümmertem Zellmaterial erfassen lassen, haben wir mit dieser Methode eine willkürliche Auswahl von Sproßpilzen untersucht (MÜLLER und KRANENBERG 1967). Diese Studie wurde jetzt auf eine größere Zahl von Hefen ausgedehnt, wobei nach Möglichkeit eine oder mehrere Arten aus jeder der von TSUCHIYA angeführten Gruppen berücksichtigt wurden.

a) Antigene Beziehungen der Candida-Arten untereinander:
Mit den gegen C. albicans, C. tropicalis, C. stellatoidea, C. krusei, C. robusta, C. utilis, C. pseudotropicalis und C. curvata gewonnenen Antiseren wurden jeweils 15 Candida-Arten gekreuzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt. Die Kreuzreaktionen wurden nach ihrer Lokalisation im immunelektrophoretischen Präparat unterteilt, d.h. es wurde unterschieden, ob das Antiserum mit den zur Anode bzw. Kathode wandernden Antigenen oder mit denen, die am Auftragspunkt liegen bleiben, Präzipitationslinien bildet.
Aus der Tabelle 3 geht hervor, daß das Serum gegen C. albicans mit den kathodenwärts wandernden Antigenen aller verwendeten Candida-Arten, außer C. lipolytica, Präzipitate bildete. Ähnliche Ergebnisse zeigten die Seren gegen C. tropicalis und C. stellatoidea. Hier fehlten Antigen-Antikörperreaktionen mit C. brumptii und C. curvata auf der Kathodenseite. Bei diesen Arten fanden wir auch mit C.albicans-Serum nur eine Präzipitationslinie.

Tabelle 3: Kreuzreaktionen der Candida-Arten untereinander

Auswertung der Immunoelektrophoresen

Antiserum →	C.alb.			C.trop.			C.stella			C.krusei			C.pseudotrop.			C.utilis			C.curvata			C.robusta		
Antigen ↓	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
C.albicans	+++	++	+++	++	++	+++	+++	+	+++	-	+	++	-	-	+	-	+	-	-	+	++	-	+	++
C.tropicalis	++	++	+++	+++	++	+++	++	+	++	-	+	++	-	-	+	-	+	+	-	+	++	-	+	++
C.stellatoidea	+++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	-	+	++	-	+	+	-	+	-	-	-	++	-	+	-
C.krusei	-	-	++	-	-	+	-	-	+	+++	++	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
C.pseudotropicalis	-	-	++	-	-	+	-	-	++	-	-	++	+++	+	++	++	+	+	-	+	++	-	+	+++
C.utilis	+	+	+	++	-	+	+	+	+	+	++	+	-	+	+	+++	++	+++	-	+	+	-	+	-
C.curvata	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	++	++	+++	-	-	++
C.robusta	+	-	++	-	-	+	+	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-	+	+	-	-	+++	+	+++
C.guilliermondii	+++	-	++	++	-	++	++	+	++	-	+	+	-	+	++	-	-	++	-	-	++	-	+	+
C.reukaufii	-	-	++	-	+	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	++	+	-	-	-	++	-	-	+
C.brumptii	++	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-
C.lipolytica	++	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-
C.parapsilosis	++	+	++	+++	+	++	-	+	++	-	-	++	-	-	++	-	+	+	+	-	+	-	+	++
C.scottii	++	++	++	-	-	+	+	-	+	-	-	+	++	-	++	-	-	+	-	-	+	-	-	+
C.macedoniensis	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+++	-	+++	-	-	+	-	+	+	-	-	+

Zeichenerklärung: An = Anode

A = Auftragspunkt

Ka = Kathode

\+ = 1 Präzipitationslinie

++ = 2 - 3 Präzipitationslinien

+++ = mehr als 3 Präzipitationslinien

\- = negative Reaktion

Das Antiserum gegen C. albicans reagierte aber auch mit zahlreichen, anodenwärts wandernden Antigenen der Candida-Arten. Hier war keine Antigengemeinschaft mit C. krusei, C. pseudotropicalis, C. curvata, C. reukaufii und C. macedoniensis zu erkennen. Auch in dieser Hinsicht bestanden nur geringe Abweichungen im Verhalten von Seren gegen C. tropicalis und C. stellatoidea. Wir hatten schon früher (MÜLLER und KRANENBERG 1967) die breite Antigengemeinschaft dieser drei Candidahefen an einer kleineren Auswahl von Sproßpilzen gefunden. Einen weiteren Beweis dafür lieferten die Reaktionen mit den übrigen Candida-Antiseren, mit denen die Antigene von C. albicans, C. tropicalis und C. stellatoidea fast identisch reagierten.
Bei Berücksichtigung aller Antigene (sowohl der anoden- und kathodenwärts wandernden, als auch der am Auftragspunkt liegen bleibenden) fanden wir eine auffallende Verwandtschaft von C. guilliermondii und C. parapsilosis mit C. albicans, C. tropicalis und C. stellatoidea.
Auch das C.krusei-Serum zeigte noch weitgehende Kreuzreaktionen mit den zur Kathode wandernden Antigenen der Candida-Arten. Hier fehlten nur Reaktionen mit C. lipolytica, C. brumptii und C. curvata. Dagegen reagierten mit ihm von den anodenwärts wandernden Antigenen nur die von C. utilis. Umgekehrt zeigten auch die anodenwärts wandernden Antigene von C. krusei keine Reaktion mit den heterologen Antiseren.
Ebenso wie die vorgenannten Antiseren besaß auch das C.pseudotropicalis-Serum Antikörper, die mit den kathodenwärts wandernden Antigenen der anderen Candidaarten reagierten, ausgenommen auch hier wieder C. lipolytica, C. curvata und C.brumptii. Das Serum enthält ferner Antikörper gegen die anodenwärts wandernden Antigene von C. brumptii, C. lipolytica, C. scottii und C. macedoniensis, mit der überhaupt eine sehr breite Antigengleichheit besteht. Bei Verwendung von C.pseudotropicalis-Antigen bestätigten sich die erwähnten Antigengemeinschaften.
Das Antiserum gegen C. utilis reagierte mit den kathodenwärts wandernden Antigenen von C. pseudotropicalis, C. robusta, C. guilliermondii, C. lipolytica, C. parapsilosis, C. scottii und C. macedoniensis. Mit den anodenwärts wandernden Antigenen

kamen nur bei wenigen Arten Reaktionen zustande, und zwar vor allem mit C. pseudotropicalis und C. reukauffi, schwächer mit C. brumptii und C. lipolytica. C.utilis-Antigen zeigte mit den bisher erwähnten Immunseren ziemlich gleichsinnige Reaktionen.

Das gegen C. curvata gewonnene Immunserum führte, mit Ausnahme von C. robusta, C. brumptii und C. lipolytica, zu Kreuzreaktionen mit den zur Kathode wandernden Antigenen aller Hefen, d.h. also auch mit C. tropicalis, C. stellatoidea, C. krusei und C. pseudotropicalis, deren Antiseren, wie oben beschrieben, umgekehrt nicht mit kathodenwärts wandernden C.curvata-Antigenen reagierten. Die Seren gegen C. stellatoidea und C. krusei bildeten jedoch, wie aus der Tabelle 3 hervorgeht, mit C. curvata-Antigen am Auftragspunkt eine Präzipitationslinie. Möglicherweise handelte es sich um die gleiche Spezifität, die nur - je nach Art der Trägersubstanz - unterschiedlich wanderte. Auf der Anodenseite bestanden Kreuzreaktionen zwischen dem C.curvata-Serum und den Antigenen von C. robusta, C. parapsilosis, C. brumptii und C. lipolytica.

Das Serum gegen C. robusta reagierte mit den Candida-Antigenen schwächer als umgekehrt das C.robusta-Antigen mit den Candidaseren. Das änderte sich auch bei mehrmaliger Nachimmunisierung nicht. Mit allen Candida-Arten entwickelte sich mindestens eine Präzipitationslinie, entweder am Auftragspunkt oder auf der Kathodenseite. Auf der Anodenseite war keine Reaktion mit den Candida-Arten zu erkennen.

b) Antigene Beziehungen anderer Sproßpilzarten untereinander.

Mit den gegen T. glabrata, T. dattila und S. rouxii gewonnenen Antiseren wurden neun Hefen verschiedener Gattungen gekreuzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. - Das T.glabrata-Serum bildete mit allen geprüften Hefen - außer Cr. neoformans - Präzipitationslinien auf der Kathodenseite, wie auch das T.glabrata-Antigen umgekehrt mit den beiden anderen Antiseren kathodenwärts präzipitierte. Auf der Anodenseite entstanden Reaktionen zwischen T.glabrata-Serum mit T. famata, T. dattila, S. rouxii und S. cerevisiae.

Tabelle 4: Kreuzreaktionen der Nicht-Candida-Hefen

Auswertung der Immunoelektrophoresen

Antiserum →	T.glabrata			T.famata			S.rouxii		
Antigen ↓	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
T. glabrata	+++	++	+++	-	-	+	++	+	+
T. famata	+	-	+	-	-	+	+	+	++
T. dattila	+	+	++	++	+	++	-	+	+
T. inconspicua	-	-	+	-	-	+	-	-	++
S. cerevisiae	+	++	++	-	-	++	+	+	++
S. rouxii	+	+	++	+	+	++	+	++	+++
Sch. octosporus	-	-	+	-	+	-	-	+	-
Cr. neoformans	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Rh. mucilaginosa	-	+	-	-	+	-	-	-	+

Zeichenerklärung: An = Anode
A = Auftragspunkt
Ka = Kathode
+ = 1 Präzipitationslinie
++ = 2 - 3 Präzipitationslinien
+++ = mehr als 3 Präzipitationslinien
- = negative Reaktion

Das Serum gegen T. dattila zeigte mit Sch. octosporus, Cr. neoformans und Rh. mucilaginosa eine Präzipitationslinie am Auftragspunkt, mit den anderen untersuchten Hefen eine oder mehrere Linien auf der Kathodenseite. Auf der Anodenseite fand sich eine Reaktion nur mit S. rouxii.
Auch das S.rouxii-Serum führte mit den meisten der untersuchten Hefen zu Präzipitationslinien auf der Kathodenseite. Eine Ausnahme machte hier nur Sch. octosporus mit einer Linie am Auftragspunkt. Das Serum reagierte ferner mit den zur Anode wandernden Antigenen von T. glabrata, T. famata, Cr. neoformans und S. cerevisiae.

c) Antigene Beziehungen der Candida-Arten zu anderen Hefen.
Mit Ausnahme der verwandten Hefen C. albicans, C. tropicalis und C. stellatoidea ließ sich keine ausgesprochene Gruppierung der Candida-Arten auf Grund antigener Beziehungen feststellen. Es sollte deshalb geprüft werden, ob auffällige Antigengemeinschaften einzelner Candida-Arten mit anderen Hefen bestehen.

1. Kreuzreaktionen von Candida-Antiseren mit anderen Hefeantigenen:
Die Ergebnisse der Immunelektrophoresen wurden unter den gleichen Gesichtspunkten in der Tabelle 5 zusammengefaßt. Zwischen den Candidaseren und den übrigen Hefeantigenen traten zahlreiche Kreuzreaktionen auf. Während das C.albicans-Serum mit den zur Kathode wandernden Antigenen aller Hefen Präzipitationslinien bildete - meist sogar mehrere Linien - blieben bei den Seren gegen C.tropicalis und C. stellatoidea mit Sch. octosporus und Cr. neoformans Antigen-Antikörperreaktionen auf der Kathodenseite aus. Auf der Anodenseite bestand dagegen weitgehende Übereinstimmung zwischen den Seren gegen C. albicans und C.stellatoidea, nicht aber mit C.tropicalis-Serum. Es reagierte auf der Anodenseite nur mit T.glabrata-Antigen.
Das Serum gegen C. krusei zeigte mit allen Hefen auf der Kathodenseite Präzipitationen. Es reagierte ferner mit den zur Anode wandernden Antigenen von T. glabrata, T.dattila, T. famata und S. cerevisiae. - Außer T. glabrata, Sch.octosporus und Cr. neoformans bildete auch das C.pseudotropi-

calis-Serum mit allen verwendeten Hefeantigenen Präzipitationslinien, jedoch nur am Auftragspunkt oder auf der Kathodenseite.
Das Serum gegen C. utilis reagierte mit den Hefen S. cerevisiae, S. rouxii und Rh. mucilaginosa auf der Kathodenseite sowie mit T. glabrata und T. famata auf der Anodenseite.
Alle untersuchten Hefen führten mit dem Serum gegen C.curvata zu einer oder mehreren Präzipitationen, jedoch nur am Auftragspunkt oder auf der Kathodenseite. Auf der Anodenseite wurde nur mit T. glabrata eine Reaktion sichtbar.

Das Serum gegen C. robusta reagierte auffallend stark mit S. cerevisiae, aber es präzipitierte auch mit den zur Kathode wandernden Antigenen von T. glabrata, Cr. neoformans, S. rouxii und Rh. mucilaginosa.

2. Kreuzreaktionen von Candida-Antigenen mit Seren gegen andere Hefearten:
Wie aus der Tabelle 6 hervorgeht, verursachten alle Candidaantigene Kreuzreaktionen mit den drei Seren gegen Torulopsis und Saccharomyces. Während die meisten Candida-Arten erhebliche Reaktionen auf der Kathodenseite und noch zusätzliche am Auftragspunkt bewirkten, führte C. lipolytica hauptsächlich auf der Anodenseite zu Präzipitaten. Abgesehen von dieser Ausnahme reagierten die Seren gegen T. glabrata und T. dattila mit keiner der untersuchten Candida-Arten auf der Anodenseite. Andererseits zeigte das Serum gegen S. rouxii Reaktionen mit der überwiegenden Zahl der Candidahefen auch auf der Anodenseite.

Nach diesen Untersuchungen läßt sich eine Gesetzmäßigkeit der Antigenmuster, sowohl der Eiweißantigene als auch der Polysaccharidantigene, in den einzelnen Gattungen nicht erkennen.

Tabelle 5: Kreuzreaktionen zwischen Homogenisaten der Nicht-Candida-Hefen mit Seren gegen Candidaarten

Auswertung der Immunoelektrophoresen

Antiserum →	C.alb.			C.trop.			C.stella.			C.krusei			C.pseudotr.			C.utilis			C.curv.			C.robusta		
Antigen ↓	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
T. glabrata	++	-	++	+	-	++	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	++
T. famata	-	+	--	-	-	-	++	+	+	++	-	++	-	-	+	++	-	-	-	-	+	-	-	-
T. dattila	+++	+	++	-	-	++	+++	-	++	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
T. inconspicua	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	++	-	-	+	-	-	-	-	-	++	-	-	-
S. cerevisiae	+	-	++	-	+	+	+	-	+	+	-	++	-	-	+	-	-	+	-	+	+	++	+	++
S. rouxii	+	-	++	-	+	-	-	+	+	-	++	++	-	+	++	-	-	+	-	+	++	-	-	++
Sch. octosporus	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Cr. neoformans	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++
Rh. mucilaginosa	-	-	++	-	-	+	-	-	+	-	-	++	-	-	++	-	-	+	-	+	+	-	-	+

Zeichenerklärung:
An = Anode
A = Auftragspunkt
Ka = Kathode
\+ = 1 Präzipitationslinie
++ = 2 - 3 Präzipitationslinien
+++ = mehr als 3 Präzipitationslinien
\- = negative Reaktion

Tabelle 6: Kreuzreaktionen zwischen Homogenisaten der Candida-arten und Seren gegen Nicht-Candida-Hefen

Auswertung der Immunelektrophoresen

Antiserum →	T.glabrata			T. dattila			S.rouxii		
Antigen ↓	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
C.albicans	+	+	++	-	+	++	+	+	-
C.tropicalis	-	+	++	-	+	++	+	+	+
C.stellatoidea	-	+	++	-	(+)	++	-	+	+
C.krusei	-	+	++	-	-	+	+	+	+
C.pseudotropicalis	-	++	++	-	+	+	+	-	++
C.utilis	-	+	+	-	+	-	++	+	+
C.curvata	-	-	+	-	-	+	-	-	+
C.robusta	-	++	++	-	-	+	-	+	++
C.guilliermondii	-	+	++	-	+	++	+	+	+
C.reukaufii	-	-	++	-	-	++	-	+	++
C.brumptii	-	+	-	-	+	-	+	-	+
C.lipolytica	++	-	-	+	+	-	++	+	-
C.parapsilosis	-	+	+	-	+	++	-	-	++
C.scottii	-	+	+	-	+	+	+	+	++
C.macedoniensis	-	-	+	-	-	+	-	-	++

Zeichenerklärung: An ≙ Anode
A = Auftragspunkt
Ka = Kathode
\+ = 1 Präzipitationslinie
++ = 2 - 3 Präzipitationslinien
+++ = mehr als 3 Präzipitationslinien
\- = negative Reaktion

III. Absorptionsversuche mit getrenntem Zellmaterial von C. albicans und C. tropicalis

Die Immunelektrophorese eignet sich zwar zur Erkennung von Kreuzreaktionen besonders gut, jedoch lassen sich bei vielen gemeinsamen Antigenen geringe Differenzen, vor allem unter den Polysaccharidantigenen, z.B. zwischen C. albicans und C. tropicalis einerseits sowie C. albicans und C. stellatoidea andererseits, nicht exakt darstellen (siehe Abbildungen 7 und 8).

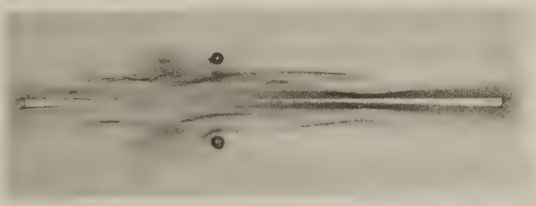


Abbildung 7: Immunelektrophorese gegen C.albicans-Serum

oben: C.albicans-Homogenisat
unten: C.tropicalis-Homogenisat

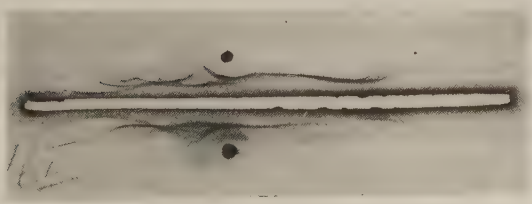


Abbildung 8: Immunelektrophorese gegen C.stellatoidea-Serum

oben: C.stellatoidea-Homogenisat
unten: C.albicans-Homogenisat

Vermutlich ließen sich die einzelnen Präzipitationslinien im Kathodenbereich so schlecht voneinander abgrenzen, weil die Polysaccharide bzw. Glykoproteide im elektrischen Feld nur wenig wanderten, so daß die Einzelantigene nicht genügend aufgetrennt wurden. Es mußte deshalb am Beispiel von C. albicans und C. tropicalis untersucht werden, wie sich geringe Antigendifferenzen am besten nachweisen lassen (MÜLLER 1966). In Anlehnung an TSUCHIYA (1955) wurden deshalb Absorptionsversuche mit intakten Hefezellen durchgeführt. Wir verwendeten dazu Immunseren, die mit nicht erhitztem und erhitztem Homogenisat, mit nicht erhitzten und erhitzten Zellwänden beider Hefen sowie mit dem nicht erhitzten Zellinhalt von C. albicans gewonnen worden waren. Die Seren gegen den Zellinhalt von C. tropicalis und den erhitzten Zellinhalt von C. albicans wurden nicht geprüft, weil sie zu geringe Antikörpermengen enthielten.

Nach Absorption der genannten Immunseren mit intakten Hefezellen ließ sich weder mit der KBR, noch mit der Röhrchenagglutination, noch mit der empfindlichsten Methode, dem Hämagglutinationstest, ein Restantikörper gegen eine der beiden Hefen nachweisen. Dagegen gelang mit Hilfe der Immunelektrophorese auch nach Absorption von C.albicans-Seren mit C.tropicalis-Zellen noch der Nachweis von Restantikörpern, die sich - wie die Abbildung 9 zeigt - mit einem zur Kathode wandernden Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigen von C. albicans darstellten, nicht aber mit den Tropicalis-Antigenen reagierten. Die Anti-C.tropicalis-Seren zeigten dagegen auch in der Immunelektrophorese nach Absorption mit C.albicans-Zellen keine gegen Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene gerichteten Restantikörper.

Um festzustellen, wo das spezifische Antigen von C. albicans lokalisiert ist, wurden die Absorptionsversuche mit getrenntem Zellmaterial fortgesetzt.

Nach Absorption von C.albicans- und C.tropicalis-Seren mit den Zellwänden beider Hefen wurden weder mit der KBR oder der Zellagglutination, noch mit dem Hämagglutinationstest Restantikörper nachgewiesen. In der Immunelektrophorese waren jedoch auch hier wieder,entsprechend der Abbildung 9, Antikörper gegen Polysaccharid-Antigene von C. albicans feststellbar. Da eine

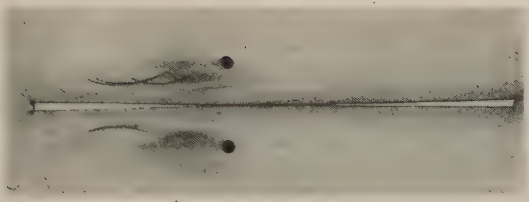


Abbildung 9: Immunelektrophorese nach Absorption eines Serums gegen C. albicans mit intakten C.tropicalis-Zellen

oben: C.albicans-Homogenisat
unten: C.tropicalis-Homogenisat

Absorption der Immunseren mit dem größtenteils löslichen Zellinhalt nicht direkt möglich war, wurden die aus dem Zellinhalt durch Phenol-Wasser-Extraktion isolierten Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene an Hammelblutkörperchen gebunden. Die Absorption der Immunseren erfolgte mit derart sensibilisierten Erythrocyten. Danach ließen sich erstmals bei einigen C.albicans-Seren noch Antikörper gegen C.albicans-Antigene mit dem Hämagglutinationstest nachweisen.

Aus der Tabelle 7 geht hervor, daß die Antikörper der C.tropicalis-Seren durch die extrahierten Polysaccharide aus C. albicans und aus C. tropicalis restlos absorbiert wurden. Gleiches galt für Seren gegen C. albicans (unerhitztes Homogenisat und unerhitzter Zellinhalt). Dagegen konnte man bei Seren, die durch Immunisierung mit dem erhitzten Homogenisat und mit den Zellwänden von C. albicans gewonnen wurden, nach der Absorption mit Tropicalis-Polysacchariden einen Resttiter gegen Albicans-Polysaccharide oder bei nicht vollständiger Absorption der Tropicalis-Antikörper eine Titerdifferenz von mindestens drei Titerstufen zugunsten der Albicans-Polysaccharide finden.

Aus unseren Untersuchungen geht in Übereinstimmung mit TSUCHIYA (1955) hervor, daß C. albicans ein Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigen mehr besitzt als C. tropicalis. Dieses für C.albicans spezifische Antigen ist sowohl im Zellinhalt als auch in der Zellwand nachweisbar.

Tabelle 7: Hämagglutinationstiter von Seren gegen C. albicans und C. tropicalis vor und nach Absorption mit sensibilisierten Erythrozyten

Antiseren gegen			Hämaggl.Titer vor Absorption		Hämaggl.Titer nach Absorption mit AP		Hämaggl.Titer nach Absorption mit TP	
			gegen		gegen		gegen	
			AP	TP	AP	TP	AP	TP
C. albicans	Homogenisat	a	2560	2560	ø	ø	ø	ø
		b	2560	2560	ø	ø	320	ø
	Membranen	a	2560	2560	ø	ø	2560	320
		b	5120	5120	ø	ø	160	ø
	Inhalt	a	320	160	ø	ø	ø	ø
C. tropicalis	Homogenisat	a	640	640	ø	ø	ø	ø
		b	320	320	ø	ø	ø	ø
	Membranen	a	1280	1280	ø	ø	ø	ø
		b	2560	5120	ø	ø	ø	ø

Zeichenerklärung: AP = Phenol-extrahierte Polysaccharide aus dem Zellinhalt von C. albicans
TP = Phenol-extrahierte Polysaccharide aus dem Zellinhalt von C. tropicalis
a = nicht erhitzt
b = erhitzt

IV. Versuche zur Isolierung von Antigenen

Die Hefen besitzen eine große Zahl von Antigenen. BIGUET (1962) fand z.B. bei C. albicans 15 Antigene. Bei Immunisierung von Tieren mit einem derart umfangreichen Antigengemisch besteht durchaus die Möglichkeit, daß nicht gegen alle Antigene Antikörper bzw. sehr unterschiedliche Titer gebildet werden. Auch reagieren die einzelnen Versuchstiere verschieden gegenüber dem Angebot. So hatten einige Kaninchen vorwiegend Antikörper gegen Eiweißantigene produziert, andere dagegen vorwiegend gegen Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene. Diese Tatsache sowie die schlechte elektrophoretische Auftrennung der Polysaccharidantigene machen es erforderlich, die einzelnen Antigene rein darzustellen oder zumindest in kleinen Gruppen zu gewinnen.

a) Gewinnung von serologisch aktiven Polysacchariden durch verschiedene Extraktionsverfahren. Um die in den Zellwänden sitzenden, unlöslichen Polysaccharidantigene zu erhalten und die Polysaccharid- von den Eiweißantigenen des Zellinhalts zu trennen, wurden verschiedene Extraktionsmethoden verglichen.
Durch die Phenol-Wasser-Extraktion nach WESTPHAL (1952) ließen sich, wie wir früher berichteten (MÜLLER, SIEGERT, PACHALY 1964), sowohl aus dem Zellinhalt als auch aus den Zellwänden der Hefen in Alkohol präzipitierbare Substanzen gewinnen. Sie waren in Wasser löslich und wanderten in der Agarelektrophorese zur Kathode. Wie zu erwarten, ließen sie sich mit PAS anfärben, dagegen nicht mit Amidoschwarz. Die Immunelektrophorese zeigt (Abbildung 10), daß diese Polysaccharide serologisch aktiv waren.
Soweit sich aus den immunelektrophoretischen Ergebnissen, deren Aussagekraft durch die schon erwähnte schlechte elektrophoretische Wanderung eingeschränkt wird, entnehmen läßt, handelte es sich bei den aus dem Zellinhalt und den Zellwänden gewonnenen Polysacchariden um die gleichen antigenen Substanzen.

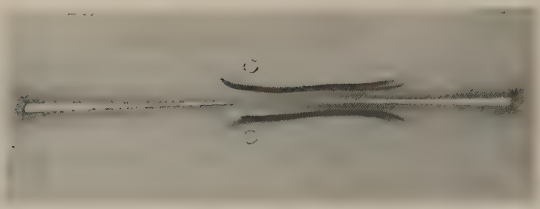


Abbildung 10: Immunelektrophorese der wäßrigen Phasen nach Phenol-Extraktion von C. albicans gegen C.albicans-Serum.

oben: Zellinhalt
unten: Zellwände

Auch durch einstündiges Kochen und durch KOH-Extraktion ließen sich aus den Zellwänden und aus dem Zellinhalt der Hefen Fraktionen gewinnen, die durch Alkohol gefällt wurden, in Wasser löslich waren und sich mit PAS anfärbten. Aus der Gegenüberstellung in der Immunelektrophorese (Abbildungen 11, 12 und 13) geht hervor, daß es sich qualitativ um die gleichen serologischen Polysaccharide handelte wie nach Phenol-Wasser-Extraktion. Quantitativ schienen jedoch Unterschiede vorzuliegen, weil sich nach einstündigem Kochen der Zellwände noch weitere Polysaccharidmengen durch anschließende KOH-Extraktion gewinnen ließen.

b) Trennung der Polysaccharide durch Gelfiltration: BÜRGER, MÜLLER und PRIEBE (unveröffentlicht) hatten versucht, die Polysaccharide von C. albicans und C. tropicalis mit Hilfe der Gelfiltration einzeln darzustellen. Dazu wurden die Polysaccharide aus dem Zellinhalt und den Zellwänden der beiden Hefen durch die Phenol-Wasser-Methode nach WESTPHAL extrahiert und, um das Auffinden der Fraktionen nach Säulenchromatographie zu erleichtern, mit dem Remazolfarbstoff "Türkisblau" der Firma Hoechst nach BÜRGER und MÜLLER (1965) angefärbt. Es ließ sich jedoch eine Auftrennung der Polysaccharide an Sephadexsäulen nicht erreichen.

Immunelektrophoresen der extrahierten Polysaccharide gegen C.albicans-Serum

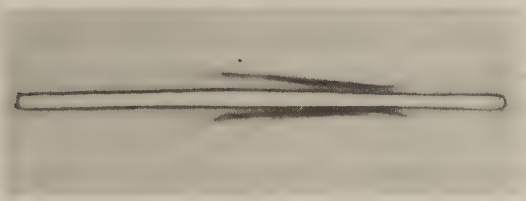


Abbildung 11: Zellwandextrakte aus C. albicans

oben: wäßrige Phase nach Phenol-Extraktion
unten: Kochextrakt

Abbildung 12: Zellwandextrakte aus C. albicans

oben: KOH-Extrakt
unten: wäßrige Phase nach Phenol-Extraktion

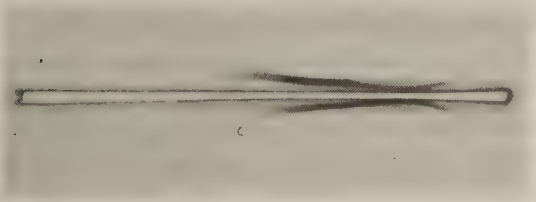


Abbildung 13: Zellinhaltextrakte aus C. albicans

oben: wäßrige Phase nach Phenol-Extraktion
unten: Kochextrakt

Nach WESTPHAL (1952) sind in der wäßrigen Phase außer Polysaccharide auch Nukleinsäuren enthalten. Die Prüfung mit Sulfosalizylsäure zeigte in den wäßrigen Phasen der Hefen auch noch Spuren von Eiweiß an. Beide Stoffe ließen sich ebenfalls mit Vinylsulfonfarbstoffen anfärben. Es mußte damit gerechnet werden, daß diese Begleitstoffe die Auftrennung verhinderten. Deshalb wurden die gewonnenen Polysaccharidfraktionen, vor allem aus dem Zellinhalt beider Hefen, von den Fremdstoffen gereinigt, indem die Eiweiße mit Sulfosalizylsäure, die Nukleinsäuren weitgehend mit N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid gefällt wurden. Zur weiteren Reinigung erfolgte noch eine Extraktion mit 1,2,2-Trifluor-1,1,2-trichloraethan nach MARKOWITZ und HENDERSON (1958), die bei den Zellwandextrakten allein genügte. Nachdem auf diese Weise alle Eiweiße und Nukleinsäuren entfernt waren, wurden die Polysaccharide dann mit dem Remazolfarbstoff angefärbt. Von verschiedenen Sephadexsorten eignete sich nur Sephadex G 200, an dem eine Auftrennung in zwei Banden - mit Wasser als Elutionsmittel - aus vier verschiedenen Proben, nämlich Extrakten aus Zellwand und -inhalt von C. albicans sowie C. tropicalis, erreicht werden konnte. Die photometrische Auswertung der Fraktionen ergab, wie Abbildung 14 zeigt, drei Gipfel. - Die im Rotationsverdampfer stark eingeengten Fraktionen wurden in der Immunelektrophorese auf ihre serologische Aktivität geprüft. Bei jedem der 4 Ausgangsmaterialien ergab sich das gleiche Bild. Der erste Gipfel enthielt, ebenso wie der zweite, mehrere serologisch unterschiedliche Polysaccharide. Dagegen ließ sich im dritten Peak nur ein einziges Polysaccharid mit serologischer Aktivität nachweisen (Abbildungen 15 und 16). Somit konnte man unter den gegebenen Bedingungen mit der Säulenchromatographie an Sephadex G 200 ein Einzelantigen bzw. Hapten abtrennen. Wie weitere Vergleiche mit einem hochmolekularen Stoff (Dextran 2000) zeigten, ist der erste Gipfel als "Ausschlußpeak" zu werten, d.h. die in ihm erscheinenden, serologisch aktiven Polysaccharide haben ein Molekulargewicht von über 200.000 und lassen sich durch Gelfiltration nicht weiter auftrennen. Diese an Sephadex isolierten, serologisch aktiven Einzelpolysaccharide aus vier Materialien - Zellwände und -inhalt von C. albicans und C. tropicalis -

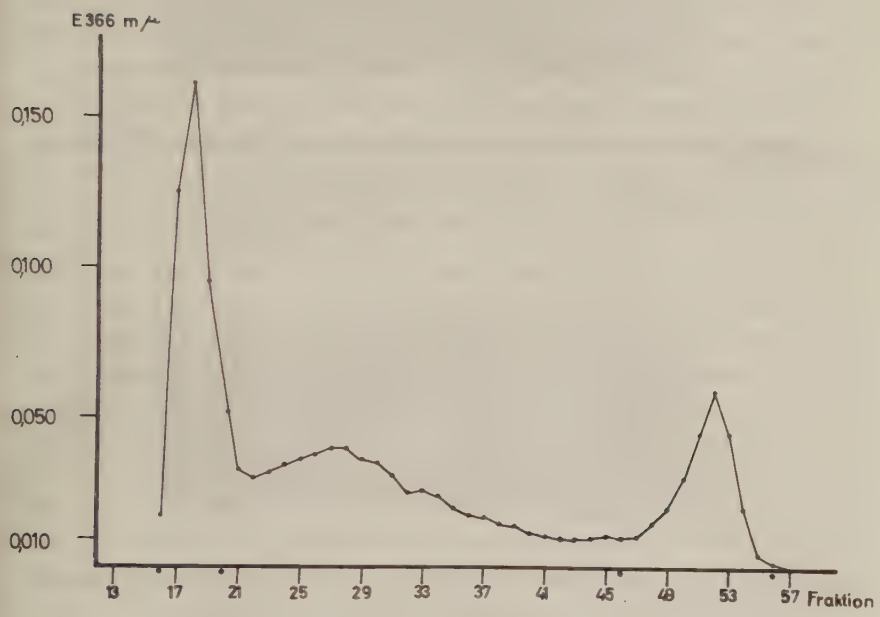


Abbildung 14: Photometrische Auswertung der nach chromatographischer Auftrennung erhaltenen Fraktionen der gereinigten Polysaccharide aus dem Zellinhalt von C. tropicalis.

Säulenfüllung: Sephadex G 200
Elutionsmittel: Wasser

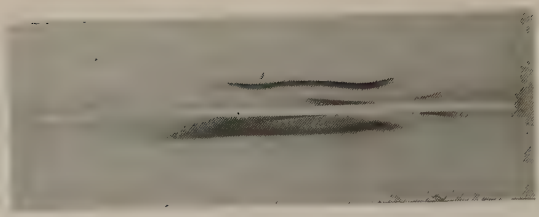


Abbildung 15: Immunelektrophorese mit Anti-C.tropicalis-Serum
oben: 1. Fraktion nach Gelfiltration
unten: 2. Fraktion nach Gelfiltration

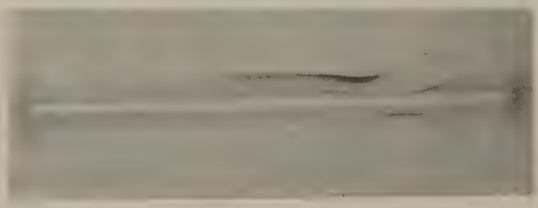


Abbildung 16: Immunelektrophorese mit Anti-C.tropicalis-Serum
oben: 1. Fraktion nach Gelfiltration
unten: 3. Fraktion nach Gelfiltration

wurden in der Immunelektrophorese miteinander verglichen. Dabei ergab sich jeweils eine Präzipitationslinie sowohl mit C.albicans- als auch mit C.tropicalis-Serum. Die aus dem Zellinhalt und den Zellwänden von C. albicans isolierten Fraktionen zeigten übereinstimmende elektrophoretische Wanderung, ebenso die beiden aus C. tropicalis isolierten Fraktionen untereinander. Dagegen ergab die Gegenüberstellung der isolierten Fraktionen aus dem Zellinhalt von C. albicans und C. tropicalis eine unterschiedliche Wanderung. Dieser Befund aber besagt noch nicht, daß es sich um verschiedene Antigene handelt; möglicherweise unterscheidet sich nur ihre Trägersubstanz, nicht aber die Spezifität. Um diese Fragen zu beantworten, müssen zuvor Antikörper gegen die isolierten

Polysaccharide gewonnen werden.
Die beschriebene Methode, die nur ein Polysaccharid abtrennt, hat den Nachteil, daß sie nicht die zur Immunisierung von Kaninchen notwendige Antigenmenge liefert. Bei den angegebenen Reinigungsschritten wurden, wie wir immunelektrophoretisch nachweisen konnten, nicht nur die Fremdstoffe, sondern auch große Mengen von serologisch aktiven Polysacchariden mitgefällt, so daß die Ausbeute an Einzelantigen außerordentlich gering war. Es wurde deshalb bei weiteren Isolierungen auf die Anfärbung mit Remazolfarbstoffen verzichtet und geprüft, ob sich die Fraktionen durch ein Ultraviolett-Absorptiometer registrieren lassen.
Die nach WESTPHAL (1952) gewonnene wäßrige Phase der Phenol-Wasser-Extraktion wurde nach Fällung in Alkohol und Lösung in Wasser ohne weitere Reinigung auf eine Sephadex-G-200-Säule aufgetragen und in 5 ml Portionen im LKB-Fraktionssammler nach Registrierung im UV-Durchflußphotometer aufgefangen. Wie die Abbildung 17 zeigt, wurden 2 Gipfel registriert. Die Prüfung ihrer serologischen Aktivität mit Hilfe der Immunelektrophorese ergab, daß sich in der ersten Fraktion eine Anzahl serologisch aktiver Polysaccharide befindet, ähnlich dem 1. und 2. Gipfel nach Chromatographie mit markierten Polysacchariden. Im 2. Gipfel war das gleiche Einzelpolysaccharid wie im 3. nach Markierung vorhanden.
Mit dem im 2. Gipfel enthaltenen Einzelantigen aus dem Zellinhalt von C. tropicalis wurden Kaninchen i.v. behandelt. Selbst nach 6-wöchiger Immunisierungsdauer mit insgesamt ca. 600 mg Polysaccharid ließ sich weder in der Immunelektrophorese, noch mit der Komplementbindungsreaktion ein Antikörper nachweisen. Auch die Verabreichung des Polysaccharids zusammen mit Freund'schem Adjuvans i.m. führte bisher nicht zur Antikörperbildung. Das Polysaccharid dürfte demnach, zumindest nach dieser Aufbereitung, Haptennatur besitzen.

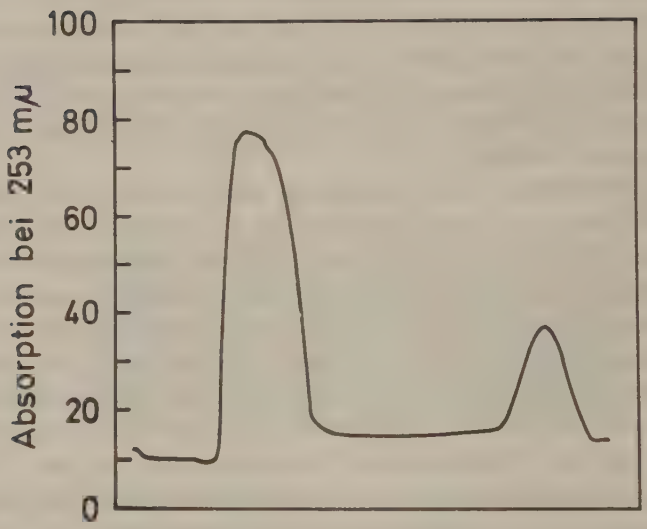


Abbildung 17: Säulenchromatographische Auftrennung der aus dem Zellinhalt von C. tropicalis durch Phenol-Wasser-Extraktion gewonnenen Polysaccharide.

Säulenfüllung: Sephadex G 200
Elutionsmittel: Wasser

c) Auftrennung der Polysaccharide durch Ammonsulfatbehandlung:
Da eine weitere Auftrennung der Polysaccharide durch Säulenchromatographie an Sephadex nicht gelang, wurde eine Fraktionierung des Antigen- bzw. Haptengemisches mit chemischen Methoden erforderlich. Die wäßrigen Phasen nach Phenol-Wasser-Extraktion, welche die Polysaccharide beinhalten, wurden mit gesättigter Ammonsulfatlösung in verschiedenen Mengen versetzt. Bei einem Anteil von 6 : 1 (Ammonsulfat- : Polysaccharidlösung) entstand ein reichlicher Niederschlag. Der Überstand und der in Wasser gelöste Niederschlag wurden nach Dialyse gegen Wasser in der Immunelektrophorese geprüft. Wie die Abbildung 18 zeigt, befanden sich im Niederschlag zwei, im Überstand mindestens vier serologisch aktive Polysaccharide. Die Polysaccharide des Überstands erfahren nach der Ammonsulfatfällung eine elektrophoretische Auftrennung, wie sie vor der Fällung nicht erreicht werden konnte.
Dieses Ergebnis veranlaßte uns, die beiden Fraktionen in der Agarelektrophorese mit Spezialfärbungen zu untersuchen. Der völlig klare Überstand wanderte in Fraktionen zur Kathode und ließ sich nur durch PAS anfärben. Am deutlichsten waren die Fraktionen sichtbar, wenn als Fixierungsmittel nicht Methyl-Eisessig, sondern 90%iger Alkohol verwendet wurde. Der in Wasser gelöste Niederschlag zeigte eine starke Opaleszenz und wanderte ebenfalls zur Kathode, ohne sich jedoch in einzelne Fraktionen aufzutrennen. Die fixierten Präparate ließen sich sowohl mit PAS, als auch nach BEST anfärben. Wurden jedoch die Präparate vorher einer 1-stündigen Einwirkung von Diastase bei 37°C ausgesetzt, so fiel die BESTsche Färbung negativ aus.
Vermutlich wurde bei Ammonsulfatbehandlung, außer zwei serologisch aktiven Polysacchariden, der Speicherstoff Glykogen mitgefällt. Die Befunde der Immunelektrophorese sprechen dafür, daß das Glykogen die Auftrennung der Polysaccharide behindert. Ähnliche Erfahrungen machten BÜRGER, MÜLLER und PRIEBE (unveröffentlicht), wenn sie Gemische von gefärbten Polysacchariden säulenchromatographisch auftrennen wollten. Die Auftrennung gelang eindeutig, wenn die Gemische nur Mono- oder Disaccharide enthielten, nicht aber, wenn gleichzeitig

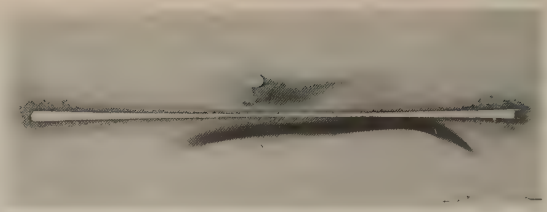


Abbildung 18: Immunelektrophorese der Fraktionen nach Ammonsulfat-Fällung aus der wäßrigen Phase des Zellinhalts von C. albicans mit Serum gegen das Homogenisat von C. albicans.

oben: Niederschlag
unten: Überstand

auch Stärke zugesetzt war. Mehrmalige Versuche, den glykogenfreien Überstand nach Ammonsulfatfällung an Sephadex G 200 aufzutrennen, blieben allerdings erfolglos.

d) Gewinnung von Eiweißfraktionen: Aufgrund der elektrophoretisch unterschiedlichen Wanderungsrichtung und der differenzierten Anfärbung mit PAS oder Amidoschwarz nehmen wir an, daß im Zellinhalt zwei antigene Substanzgruppen vorhanden sind (siehe C Ib). Bei der einen Gruppe handelt es sich vermutlich um Polysaccharide bzw. Glykoproteine, bei der anderen um Proteine. Diese Vermutung wurde bestätigt durch die Absorptionsversuche mit intakten Zellen, Zellwänden und mit Polysaccharid- bzw. Glykoprotein beladenen Erythrozyten, die immer nur einen Schwund derjenigen Antikörper ergab, welche gegen die zur Kathode wandernden Antigene gerichtet waren. Die absorbierten Seren vermochten dagegen die zur Anode wandernden Antigene voll zu erfassen (siehe C III).
Auch auf der Anodenseite finden wir eine Vielzahl von Antigenen, die eine exakte Abgrenzung und Auszählung häufig erschwert. Es wurde deshalb zunächst an C. albicans versucht, die Eiweißantigene zu isolieren.

Da sich die beiden Gruppen auf den mit Agar beschichteten Objektträgern elektrophoretisch gut trennen ließen, lag es nahe, dies auch im präparativen Maßstab zu versuchen. Wie wir früher berichteten (MÜLLER, STOLZENBACH 1967), wurde dieses Ziel weder an Agar, Sephadex noch Polyvinylchlorid erreicht. Nur auf der Kathodenseite ließen sich Spuren serologischer Aktivität nachweisen.
Auch die Ionenaustauschchromatographie brachte nicht den erwünschten Erfolg. An DEAE-Cellulose-Säulen wurde nur ein Gipfel gewonnen, der eine Vielzahl serologisch aktiver, zur Kathode wandernder Substanzen enthielt. Die vor der Chromatographie nachweisbaren, zur Anode wandernden Substanzen waren vermutlich infolge Denaturierung nicht mehr zu erfassen. Die Ionenaustauschchromatographie an CM-Cellulose-Säulen ergab zwar bei ansteigender Molarität und ansteigendem pH-Wert, wie die Abbildung 19 zeigt, 12 Gipfel, jedoch waren nur im 1. und 2. serologisch aktive Substanzen nachweisbar, bei denen es sich wiederum nur um kathodenwärts wandernde Antigene handelte.
Da diese Behandlungsmethoden für die empfindlichen Eiweißantigene anscheinend zu robust sind, wurde nach einer schonenderen Eiweißfällung gesucht. Hierzu bot sich die bei der Auftrennung von Plasmaproteinen übliche Ammonsulfatfällung an. Durch Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung zum gleichen Volumen frisch gewonnener Zellinhaltaufschwemmung ließ sich nach etwa 4 Std. bei 4°C durch Zentrifugation ein geringer Niederschlag gewinnen. Er war nur zum Teil in physiol. NaCl-Lösung löslich und zeigte bei Prüfung in der Agarelektrophorese eine mit Amidoschwarz anfärbbare Bande auf der Anodenseite in der Nähe des Auftragspunktes, jedoch keine serologische Aktivität in der Immunelektrophorese (Abbildung 20). Der nach 50%iger Ammonsulfatfällung erhaltene Überstand wurde auf eine 90%ige Sättigung gebracht. Nach etwa 18 Std. im Kühlschrank ließ sich ein reichlicher Niederschlag gewinnen, der, in Wasser gelöst, in der Immunelektrophorese mit C.albicans-Serum zwei Präzipitationslinien auf der Anodenseite, eine am Auftragspunkt und mehrere auf der Kathodenseite bildete.

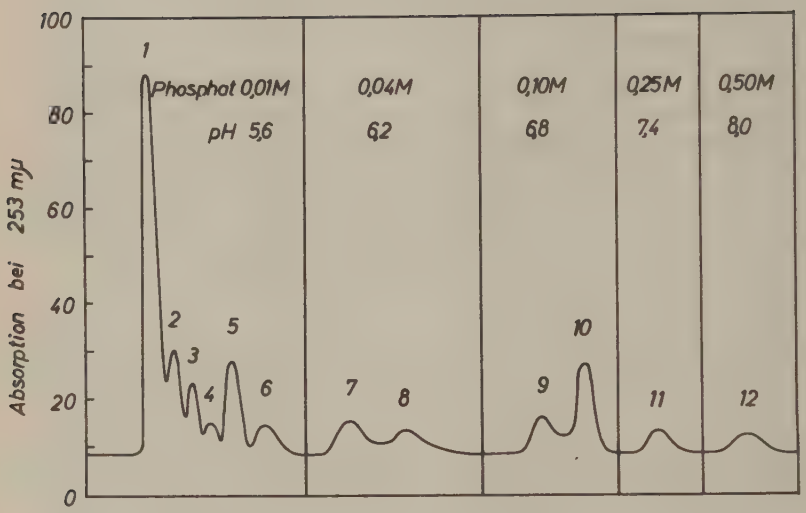


Abbildung 19: Säulenchromatographische Auftrennung des Zellinhalts von C. albicans.

Säulenfüllung: CM-Cellulose
Elutionsmittel: Phosphatpuffer mit steigender Molarität und pH-Wert

Immunelektrophoresen der durch Ammonsulfatbehandlung erhaltenen Fraktionen aus dem Zellinhalt von C. albicans gegen C. albicans-Serum

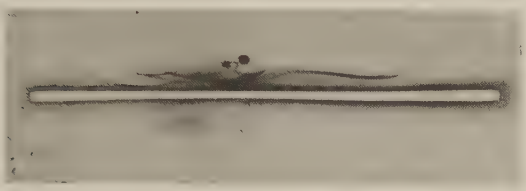


Abbildung 20: oben: Homogenisat von C. albicans
unten: Niederschlag nach 50%iger Sättigung

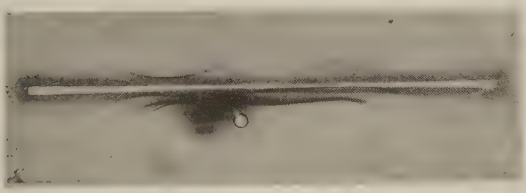


Abbildung 21: oben: an Biogel gereinigter Niederschlag nach 90%iger Sättigung
unten: Homogenisat von C. albicans

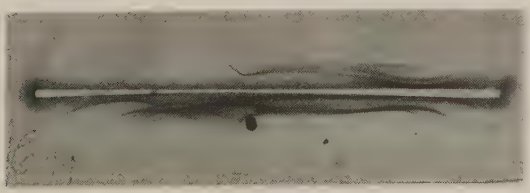


Abbildung 22: oben: Überstand nach 90%iger Sättigung
unten: Homogenisat von C. albicans

Versuche, die im Niederschlag nach 90%iger Ammonsulfatfällung enthaltenen Eiweißantigene weiter aufzutrennen, schlugen sowohl bei Verwendung von Sephadex als auch von Biogel fehl. An Biogel P-300 ließ sich zwar der kathodenwärts wandernde Anteil der Antigene abtrennen, es konnten aber nur noch Eiweißantigene zurückgewonnen werden, die im gleichen Gipfel erschienen (Abbildung 21).
Im Überstand nach der letzten Ammonsulfatfällung ließen sich nur noch kathodenwärts wandernde Antigene nachweisen (Abbildung 22).

V. Kreuzreaktionen zwischen isolierten Fraktionen und Antiseren gegen heterologe Sproßpilze

a) Polysaccharidfraktionen nach Phenol-Wasser-Extraktion:
Aus dem Zellinhalt von C. albicans, C. tropicalis, C. stellatoidea sowie C. krusei wurden die serologisch aktiven Polysaccharide mit Hilfe der Phenol-Wasser-Extraktion extrahiert. Dabei kam bei C. albicans und C. tropicalis die Wärmeextraktion, bei C. stellatoidea und C. krusei die Kälteextraktion zur Schonung der thermolabilen Antigene zur Anwendung. Anschließend wurde die in C IVc beschriebene Ammonsulfatbehandlung durchgeführt. Die auf diese Weise gewonnenen Antigenfraktionen wurden mit den Antiseren gegen die Homogenisate der Sproßpilze in der Immunelektrophorese geprüft (Tabelle 8).

Von den beiden im Ammonsulfatniederschlag des Wärmeauszugs von C. albicans enthaltenen Polysacchariden reagierte jeweils eines mit fast allen untersuchten Seren (Ausnahme: Antiseren gegen S. rouxii und C. krusei). Die Polysaccharide des Überstands zeigten mit den Seren gegen C. albicans, C. tropicalis und T. glabrata die gleiche Zahl von Präzipitationslinien. Mit dem C. robusta-Serum reagierten nur drei der Polysaccharide, mit den Antiseren gegen C. stellatoidea, C. krusei, C. curvata, T. dattila und S. rouxii entstanden jeweils zwei Präzipitationslinien. Die Seren gegen C. pseudotropicalis und C. utilis erfaßten nur eines der Polysaccharide im Überstand. Die Reaktionen des Niederschlags und des Überstandes entsprachen denen des Homogenisats von C. albicans. Nur das

Tabelle 8: Kreuzreaktionen zwischen den aus den wäßrigen Phasen der Phenol-Wasser-Extraktion durch Ammonsulfatbehandlung gewonnenen Fraktionen mit heterologen Seren.

Auswertung der Immunoelektrophoresen

Antigen →	$(NH_4)_2SO_4$ - Behandlung von							
	IAWW		ITWW		ISWK		IKWK	
Antiserum ↓	Niederschlag	Überstand	Niederschlag	Überstand	Niederschlag	Überstand	Niederschlag	Überstand
C.albicans	++	+++++	+	+++++	++	+++	++	+++
C.tropicalis	+	+++++	+	+++++	++	+++	-	+++
C.stellatoidea	+	++	-	++	++	+++	+	++
C.krusei	-	++	-	+++	++	++	+++	++++
C.pseudotropicalis	+	+	-	+	++	++	+	++
C.utilis	+	+	-	+	-	++	-	-
C.curvata	+	++	-	+++	+	+	+	++
C.robusta	+	+++	-	++	++	++	+	++
T.glabrata	+	+++++	-	+++++	++	+++++	++	+++
T.dattila	+	++	-	++	++	++	+	+
S.rouxii	-	++	-	+	+	++	+	++

Zeichenerklärung: IAWW = Inhalt Albicans, wäßrige Phase, Wärmeauszug

ITWW = Inhalt Tropicalis, wäßrige Phase, Wärmeauszug

ISWK = Inhalt Stellatoidea, wäßrige Phase, Kälteauszug

IKWK = Inhalt Krusei, wäßrige Phase, Kälteauszug

Jedes Kreuz bedeutet eine Präzipitationslinie.

C.robusta-Serum ließ mehr gemeinsame Antigene mit den Fraktionen als mit dem Homogenisat von C. albicans erkennen.
Im Ammonsulfatniederschlag des Wärmeauszugs von C. tropicalis war nur ein einziges, serologisch aktives Polysaccharid festzustellen, das mit den Seren gegen C. albicans und C. tropicalis reagierte. Die fünf Polysaccharide des Überstands bildeten auch mit den Seren gegen C. albicans und T. glabrata vier Präzipitationslinien, mit den Seren gegen C. krusei und C. curvata reagierten dagegen nur drei und mit den Seren gegen C. stellatoidea, C. robusta und T. dattila nur zwei der Polysaccharide. Die Seren gegen C. pseudotropicalis, C. utilis und S. rouxii präzipitierten schließlich nur eines der Polysaccharide des Überstands.
Der bei Ammonsulfatbehandlung des Kälteauszugs von C. stellatoidea entstehende Niederschlag zeigte drei Präzipitationslinien, die mit dem homologen Serum und sonst nur noch mit dem T.glabrata-Serum zustandekamen. Außer mit dem Serum gegen C. utilis, das keine Reaktion mit dem Niederschlag ergab, führten alle übrigen Seren zu zwei, nur C.curvata-Serum zu einer Präzipitationslinie. - Der Überstand, der mit dem homologen Serum drei Polysaccharidlinien ergab, reagierte mit allen untersuchten Seren. Mit Antiseren gegen C. albicans und C. tropicalis bildeten sich drei, mit den Seren gegen C. krusei, C. pseudotropicalis, C. utilis, C. robusta, T. dattila und S. rouxii zwei und mit dem Serum gegen C. curvata nur eine Präzipitationslinie aus.
Der Niederschlag des Kälteauszugs von C. krusei, der als einziger keine starke Opaleszenz aufwies, bildete nur mit dem homologen Serum drei Präzipitationslinien. Mit den Antiseren C. albicans und T. glabrata reagierten zwei der Polysaccharide, mit den übrigen Seren, außer C. tropicalis und C. utilis, die keine Reaktion zeigten, nur eines der Polysaccharide. Im Überstand ließen sich mit dem homologen Serum vier Polysaccharidantigene nachweisen, von denen drei mit den Seren gegen C. albicans, C. tropicalis, T. glabrata, T. dattila und S. rouxii reagierten. Zwei Präzipitationslinien entstanden mit den Seren gegen C. stellatoidea, C. pseudotropicalis, C. curvata und C. robusta, während das Serum

gegen C. utilis keine Reaktion mit dem Überstand aus der wäßrigen Phase der Phenol-Extraktion aus dem Inhalt von C. krusei zeigte.

b) Eiweißfraktionen nach $(NH_4)_2SO_4$-Behandlung: Der Zellinhalt von C. albicans, C. tropicalis, C. krusei, C. pseudotropicalis und C. utilis wurde der in C IVd beschriebenen Behandlung mit gesättigter Ammonsulfatlösung unterzogen. Die Auswahl dieser Sproßpilze erfolgte aus folgenden Gründen:
C. albicans und C. tropicalis sind sich in der Antigenstruktur ihrer Zellwand so ähnlich, daß sie früher häufig für serologisch identisch gehalten wurden. Wir fanden aber unter den Eiweißantigenen beider Arten deutliche Unterschiede.
C. pseudotropicalis und C. krusei wiesen bei unseren Untersuchungen keine Antigengemeinschaften mit den Eiweißantigenen von C. albicans und C. tropicalis auf. Dafür zeigte C. utilis ein gemeinsames Eiweißantigen mit C. albicans und C. krusei. Wir glauben, daß diese Auswahl trotz der relativ geringen Zahl von Arten ein breites Spektrum von Eiweißantigenen erfaßt.
Die Niederschläge nach 50%iger Sättigung mit Ammonsulfat erwiesen sich für diese Untersuchungen als ungeeignet. Sie reagierten, vermutlich durch ihre schlechte Löslichkeit oder Denaturierung, entweder nicht mit den Antiseren, oder sie zeigten, wie der Niederschlag von C. krusei und C. utilis, Reaktionen, die auch mit dem 90%igen Niederschlag erzielt wurden.
Die Reaktionen der Niederschläge nach 90%iger Sättigung mit den Antiseren gegen die Sproßpilze sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Alle Fraktionen, die später auch zur Immunisierung verwendet wurden, stellten ein Gemisch aus mehreren Chargen dar. Auf eine säulenchromatographische Trennung der Polysaccharide bzw. Glykoproteine wurde verzichtet, da hierbei, wie das Beispiel an C. albicans zeigt, auch Eiweißantigene verlorengehen.
Wie die Tabelle 9 zeigt, reagierten die Niederschläge von C. albicans und C. tropicalis sowohl in Bezug auf die Eiweiß-, als auch auf die Glykoproteinantigene fast gleichsinnig mit den heterologen Seren (Ausnahme: T.glabrata- und S.rouxii-Serum.

Tabelle 9: Kreuzreaktionen mit den nach 90%iger Ammonsulfatsättigung erhaltenen Niederschlägen gegen heterologe Seren.

Auswertung der Immunoelektrophoresen

Antigen →	Niederschläge nach 90%iger $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung von														
	C.alb.			C.tropic.			C.krusei			C.pseudotrop.			C.utilis		
Antiserum ↓	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
C.albicans	+	+	+++	+	+	++	-	-	-	-	-	-	-	+	+
C.tropicalis	+	+	+++	+	+	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.stellatoidea	-	+	++	+	-	++	-	+	-	-	-	+	-	+	-
C.krusei	-	-	+	-	+	+	+++	+	+	-	-	+	+	-	+
C.pseudotropicalis	-	+	+	-	-	+	-	-	-	++	+	++	-	-	-
C.utilis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++++	+	+
C.curvata	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
C.robusta	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+++	-	-	+
T.glabrata	+	+	++	-	-	++	-	-	+	-	-	+	+	+	++
T.dattila	-	++	++	-	++	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
S.rouxii	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

Zeichenerklärung: An = Anode
A = Auftragspunkt
Ka = Kathode
Jedes Kreuz bedeutet eine Präzipitationslinie.

Die drei zur Anode wandernden Antigene des Niederschlags von C. krusei zeigten mit keinem der Seren eine Reaktion. Dagegen bildete das mitgefällte Glykoproteinantigen, das zur Kathode wanderte, jeweils eine Präzipitationslinie mit den Seren gegen C. robusta und T. glabrata.
Auch die beiden Eiweißantigene des Niederschlags von C. pseudotropicalis reagierten mit keinem der anderen Seren. Die zur Kathode wandernden Glykoproteinantigene bildeten dagegen, mit Ausnahme der Seren gegen C. albicans, C. tropicalis und C. utilis, mit allen Seren eine, mit C. robusta sogar mehrere Präzipitationslinien. - Der Niederschlag von C. utilis zeigte mit dem homologen Serum sogar vier Präzipitationslinien auf der Anodenseite. Von diesen reagierte jeweils eines mit den Seren gegen C. krusei und T. glabrata im Sinne einer Antigen-Antikörperreaktion. Das zur Kathode wandernde Antigen bildete mit den Seren gegen C. albicans, C. krusei, C. robusta und S. rouxii eine, mit T. glabrata zwei Präzipitationslinien.

c) Antigene des Überstandes nach 90%iger Ammonsulfatbehandlung:
Auch der Überstand nach 90%iger Ammonsulfatbehandlung der fünf untersuchten Sproßpilze wurde mit den heterologen Seren gekreuzt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 10 zusammengefaßt. Mit Ausnahme des Überstandes von C. utilis fanden sich in den übrigen Überständen keine zur Anode wandernden Antigene mehr. Für C. utilis scheinen andere Verhältnisse vorzuliegen als bei den übrigen Arten. So fanden wir nach Extraktionen auch zur Anode wandernde PAS-positive Fraktionen, die im Homogenisat nicht nachweisbar waren. Ob sich hier durch Denaturierung oder Abtrennung der Trägersubstanz die Wanderungsrichtung änderte, bedarf weiterer Untersuchungen, auf die an anderer Stelle eingegangen werden wird.
Auf der Kathodenseite führten, wie der Vergleich der Tabellen 9 und 10 zeigt, die Überstände aller Sproßpilze mit allen Seren zu weitgehend ähnlichen Reaktionen wie mit den Niederschlägen. Es liegt die Vermutung nahe, daß die Fällung der Glykoproteine keine qualitative Trennung der Antigene bedeutet, sondern daß ein Teil der Polysaccharide bzw. Glykopro-

Tabelle 10: Kreuzreaktionen mit den nach 90%iger Sättigung des Zellinhalts erhaltenen Überständen gegen heterologe Seren.

Auswertung der Immunoelektrophoresen

Antigen →	Überstand nach 90%iger $(NH_4)_2SO_4$-Sättigung von														
	C.albicans			C.tropical.			C.krusei			C.pseudotrop.			C.utilis		
Antiserum ↓	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
C.albicans	-	++	+++	-	-	+++	-	-	++	-	-	+	+	+	-
C.tropicalis	-	++	+++	-	-	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.stellatoidea	-	-	++	-	-	+++	-	-	(+)	-	-	+	+	-	(+)
C.krusei	-	-	+	-	+	+	-	-	++	-	-	+	-	+	-
C.pseudotropicalis	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
C.utilis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	-	++++
C.curvata	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
C.robusta	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	++	-	-	+
T.glabrata	-	++	++	-	++	++	-	+	+	-	-	++	-	-	++
T.dattila	-	++	++	-	++	++	-	-	+	-	-	++	-	-	+
S.rouxii	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-

Zeichenerklärung: An = Anode
A = Auftragspunkt
Ka = Kathode
Jedes Kreuz bedeutet eine Präzipitationslinie.

teine gefällt wird, ein anderer mit gleicher serologischer Spezifität im Überstand verbleibt.

VI. Immunisierungsversuche mit den durch Ammonsulfatfällungen gewonnenen Fraktionen aus fünf Sproßpilzen

Immunisierungsversuche mit den aus den Phenol-Wasser-Extraktionen durch Behandlung mit der sechsfachen Ammonsulfatmenge gewonnenen Fraktionen führten weder bei i.v. Verabreichung, noch bei i.m. Injektionen mit Freund'schem Adjuvans an Kaninchen zu präzipitierenden Antikörpern. Bei den so behandelten Tieren traten lediglich geringe Agglutinationstiter auf, die jedoch für eine Identifizierung der Sproßpilze nicht ausreichten. Die Inhalt-Glykoproteine stellen schon in natürlichem Zustand nur schwache Antigene dar (siehe C Ib sowie KEMP und SOLOTOROWSKY 1964). So ist es nicht verwunderlich, daß sie bei Phenolbehandlung - möglicherweise durch Denaturierung oder Abtrennung des Eiweißträgers - ihre Antigenität gänzlich verloren.

Dagegen induzierte die Behandlung mit den Niederschlägen nach 90%iger Ammonsulfatsättigung des Zellinhalts eine gute Antikörperbildung.

VII. Kreuzreaktionen zwischen den Seren, die gegen die Niederschläge nach 90%iger Ammonsulfatsättigung aus dem Zellinhalt von fünf Candidaarten gewonnen wurden, und heterologen Sproßpilzhomogenisaten

Mit den Niederschlägen nach 90%iger Ammonsulfatsättigung des Zellinhalts von fünf Sproßpilzarten wurden Kaninchen immunisiert. Die Auswahl der fünf Candidaarten richtete sich nach den in C Vb erwähnten Gesichtspunkten. Diese Antiseren wurden in der Immunelektrophorese mit den Homogenisaten aller zur Verfügung stehenden Sproßpilzen gekreuzt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 11 zusammengefaßt.

Obgleich die Niederschläge, wie die immunelektrophoretischen Versuche mit den gegen die Homogenisate der Hefen gerichteten Antiseren zeigten, Polysaccharide bzw. Glykoproteine enthielten, wurden bei Immunisierung im allgemeinen nur Antikörper gegen die

Tabelle 11: Kreuzreaktionen zwischen den Seren, die gegen die Niederschläge nach 90%iger Ammonsulfatbehandlung der Zellinhalte gewonnen wurden, und heterologen Sproßpilz-Homogenisaten.

Auswertung der Immunoelektrophoresen

Antiserum →	C.alb.			C.trop.			C.krusei			C.pseudo-tropic.			C.utilis		
Antigen ↓	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka	An	A	Ka
C.albicans	++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.tropicalis	+	-	-	++	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
C.stellatoidea	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.krusei	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
C.pseudotropicalis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-
C.utilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-
C.curvata	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.robusta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.guilliermondii	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.reukaufii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.brumptii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.lipolytica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
C.parapsilosis	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C.scottii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
C.macedoniensis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-
T.glabrata	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
T.famata	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-
T.dattila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T.inconspicua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.cerevisiae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S.rouxii	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr.neoformans	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rh.mucilaginosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sch.octosporus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung: An = Anode
A = Auftragspunkt
Ka = Kathode
Jedes Kreuz bedeutet eine Präzipitationslinie.

Proteinantigene gewonnen. Eine Ausnahme machte der Niederschlag von C. pseudotropicalis, der auch einen Antikörper gegen ein Polysaccharid bzw. Glykoprotein induzierte. Möglicherweise hätten sich durch Konzentrierung der γ-Globuline auch bei den anderen Seren noch Antikörper gegen Polysaccharide nachweisen lassen. Da es uns aber nur auf die Eiweißantigene ankam, haben wir darauf verzichtet.

Von den drei mit dem Niederschlag von C. albicans gewonnenen Antikörpern reagierten zwei mit C. stellatoidea und T. glabrata, einer mit C. tropicalis. Mit allen anderen Hefen blieben Antigen-Antikörperreaktionen aus. Auch gegen den Niederschlag von C. tropicalis wurden drei Antikörper gebildet, von denen jeweils einer mit C. albicans, C. guilliermondii und C. parapsilosis reagierte.

Die gegen den Niederschlag von C. krusei induzierten Antikörper bildeten mit T. famata zwei Präzipitationslinien. Alle anderen Hefen reagierten nicht mit diesem Serum.

Das Serum gegen den Niederschlag von C. pseudotropicalis enthielt zwei Antikörper gegen Protein-und einen gegen Polysaccharidantigene. Alle drei Antikörper reagierten auch mit C. macedoniensis; jeweils einer mit Eiweißantigenen von C. tropicalis, C. scottii und T. glabrata. Die beiden letztgenannten Hefen enthielten auch noch ein Polysaccharidantigen, das mit diesem Antiserum erfaßt wurde.

Schließlich waren auch im Serum gegen den Ammonsulfatniederschlag von C. utilis drei Antikörper nachweisbar. Von diesen reagierte jedoch nur einer mit C. lipolytica.

D. BESPRECHUNG

I. Antigene der Sproßpilze und ihre Lokalisation

In vergleichenden Untersuchungen an C. albicans und C. tropicalis mit verschiedenen serologischen Methoden erwies sich die Immunelektrophorese am erfolgreichsten bei Erfassung der Antigene. Mit dieser Untersuchungstechnik konnten bei Verwendung von Zellhomogenisat als Antigen und dem dagegen gerichteten Immunserum zwei serologisch aktive Substanzgruppen nachgewiesen werden, von denen die eine zur Kathode, die andere zur Anode wandert. Nur ein geringer Anteil vermutlich beider Gruppen blieb am Auftragspunkt liegen. An Agarelektrophorese-Präparaten ließen sich die zur Anode wandernden Substanzen nur mit Eiweißfärbungen, z.B. Amidoschwarz, Lichtgrün und Azocarmin, darstellen, während die zur Kathode wandernden Substanzen nur schwach mit Amidoschwarz, aber intensiv mit PAS angefärbt werden konnten (Abbildung 3). Beide Substanzgruppen enthalten mehrere Fraktionen.

Nach Trypsinbehandlung (1%ig, 1 Std. 37°C) des Zellhomogenisats war auf der Anodenseite keine serologische Aktivität mehr nachweisbar, während auf der Kathodenseite noch die gleiche Zahl von Präzipitationslinien wie vor Trypsinbehandlung, allerdings nahe an den Grabenrand verlagert, vorhanden waren (MÜLLER 1966a). Die beiden Substanzgruppen unterscheiden sich demnach durch ihre elektrophoretische Wanderungsrichtung, ihre Anfärbbarkeit und durch ihr Verhalten gegenüber Trypsin.

Aufgrund dieser Befunde ist die Annahme berechtigt, daß es sich bei den zur Anode wandernden Antigenen um Proteine, bei den kathodenwärts wandernden um Glykoproteine handelt, deren serologische Aktivität durch die Polysaccharidkomponente bestimmt wird.

Auch BIGUET (1962) erfaßte mit der Immunelektrophorese in homogenisiertem Zellmaterial Protein- und Glykoproteinantigene, ohne sie jedoch zu lokalisieren. Andere Autoren, wie TOMCSIK (1930), NEGRONI (1934), THJØTTA und JONSON (1952), ELINOV und ZAIKINA (1959), AKIBA (1961), KITAMURA (1961), SUMMERS (1964) et al., wiesen jedoch bei Sproßpilzen nur Polysaccharide bzw. Glykoproteine nach. Die Diskrepanz läßt sich einerseits mit den verwendeten Extraktionsverfahren, die eine Denaturierung der Eiweiße bewirken können, z.B. durch Extraktion mit Alkali (KEMP und SOLOTOROWSKY 1964), ß-Naphtol (ELINOV und ZAIKINA 1959 und HASENCLEVER und MITCHELL 1964), oder Formamidbehandlung (JONSON 1955 und POSPISIL 1959), andererseits mit der Herstellung der Immunseren durch Injektion intakter Hefezellen erklären.

Unsere Untersuchungen an getrenntem Zellmaterial zeigten, daß sowohl die Zellwand als auch der Zellinhalt antigene Substanzen enthalten. Proteine und Glykoproteine waren aber nur im Zellinhalt nachweisbar, in der Zellwand fanden sich nur Glykoproteine. Deshalb ist es verständlich, daß bei Immunisierung mit Zellwandmaterial nur Antikörper gegen Glykoproteine entstehen, und bei Absorption von Seren mit intakten Zellen oder Zellwänden nur die gegen Glykoproteine gerichteten Antikörper entfernt werden (siehe C Ib und C III). Diese Tatsache erklärt auch den Befund, daß die gegen den Zellinhalt von C. albicans gerichteten Seren, im Gegensatz zu anderen Immunseren, in der Zellagglutination einen niedrigeren Titer ergaben als in der Komplementbindungsreaktion. Bei Verwendung intakter Zellen können ja nur diejenigen Antikörper, die gegen die Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene gerichtet sind, agglutinierend wirken. Bei der Komplementbindungsreaktion homogenisierter Zellen werden dagegen auch die gegen die Eiweißantigene gerichteten Antikörper erfaßt. Immunseren gegen den erhitzten Zellinhalt von C. albicans enthalten, wie die Ergebnisse der Immunelektrophoresen zeigten, hauptsächlich Antikörper gegen Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene, weil der größte Teil der Eiweißantigene thermolabil ist.

Nach unseren Befunden befindet sich sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden die gleiche Zahl von Glykoproteinantigenen der gleichen serologischen Spezifität. Bei Immunisierung

mit Zellinhalt erwiesen sich die Eiweiße als die stärkeren Antigene. Deshalb ließen sich die Antikörper gegen die Proteinantigene leicht nachweisen, die Antikörper gegen die Glykoproteine dagegen erst nach Isolierung und Anreicherung der γ-Globulinfraktion (siehe C Ib). So bezeichnen KEMP und SOLOTOROWSKY (1964), die wie wir die Antikörper gegen getrenntes Zellmaterial untersuchten, aber methodisch bedingt nur Glykoproteine erfaßten, das Cytoplasma der Hefen als schwaches Antigen. Im Gegensatz zu uns fanden sie das Antigen 5 sowie die thermolabilen Antigene a, b und c nach TSUCHIYA (1955) nur im Zellinhalt. Wäre das Antigen 5 wirklich dort lokalisiert, so hätte es TSUCHIYA mit seiner Methode (Immunisierung und Absorption mit intakten Zellen) gar nicht erfassen können, weil damit nur die Oberflächenantigene der Zellwand nachweisbar sind. Andererseits hätten wir die Antikörper gegen die homologen Glykoproteine bei Absorption der Antiseren, die gegen das Zellhomogenisat gerichtet waren, mit intakten Zellen oder Zellwänden nicht vollständig entfernen können. Vielmehr hätten wir den Antikörper gegen das Antigen 5 mit Hilfe des Hämagglutinationstestes (mit Polysacchariden des Zellinhaltes sensibilisierte Erythrozyten) und der Immunelektrophorese (nur die Inhaltstoffe des Homogenisats wandern) finden müssen.

Während sich die Eiweißantigene gut differenzieren lassen, sind feine Unterschiede unter den Polysaccharidantigenen vor allem dann, wenn zahlreiche Antigenverwandtschaften bestehen, schlecht nachweisbar. Dies ist z.B. bei den Sproßpilzen C. albicans und C. tropicalis der Fall, die nach TSUCHIYA (1955 - 1965) 6 gemeinsame Antigene besitzen und sich nur in einem spezifischen Antigen unterscheiden. Nach unseren Erfahrungen lassen sich derart geringe Antigendifferenzen am besten durch die Kombination von Absorption und Immunelektrophorese erfassen. Die Absorption mit sensibilisierten Erythrozyten war der Bindung an intakte Hefezellen überlegen. Hiermit wurden auch noch solche Restantikörper erfaßt, die sich mit den üblichen serologischen Methoden nicht nachweisen ließen. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß an der Zahl der gebildeten Präzipitationsbögen nach heterologer Absorption abgelesen werden kann, in wieviel Antigenen sich die verglichenen Hefen unterscheiden. Die Kombination

dieser beiden Methoden bewährte sich sowohl beim Nachweis von Antigendifferenzen zwischen C. albicans und C. stellatoidea als auch beim Nachweis thermolabiler Antigene (MÜLLER 1965a,b).

Für die serologische Differenzierung benötigt man monospezifische Immunseren. Man gewinnt sie, indem man die heterospezifischen Antikörper durch Absorption daraus entfernt. TSUCHIYA (1959) berichtete, daß sich dazu Antiseren gegen erhitzte C.albicans-Zellen besser eignen als Immunseren gegen unerhitzte Hefezellen. Hierfür scheint die Zahl der Antigene mitverantwortlich zu sein, mit der die Immunisierung erfolgte. Für diese Vorstellung spricht, daß nur die Seren gegen die Zellwände und gegen das erhitzte Homogenisat zu monospezifischen Antiseren gegen C. albicans absorbiert werden konnten. Die Zellwände enthalten nur Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene,im erhitzten Homogenisat sind daneben nur noch wenige thermostabile Eiweißantigene. Im unerhitzten Homogenisat befindet sich dagegen zusätzlich noch eine Vielzahl thermolabiler Eiweißantigene des Zellinhalts, die ebenfalls zur Antikörperbildung führen und damit die Herstellung monospezifischer Seren erschweren.

II. Chemie der Sproßpilze und ihrer Antigene

Während nach älteren Angaben die Zellwände der Hefen aus Hemicellulosen bestehen, ist nach heutiger Ansicht (SILBEREISEN 1960) das Strukturpolysaccharid eine Polyose mit ungewöhnlicher 1,3-Verkettung von Glucoseresten. Nach NORTHCOTE und HERNE (zit. nach SILBEREISEN 1960) besteht die Zellwand nach mechanischer Behandlung und Extraktion seiner in kaltem Wasser löslichen Bestandteile zu etwa 29 % aus Hefeglucan. Daneben sollen noch Mannan mit etwa 31 % und geringe Mengen an Protein, Lipid und Chitin vorhanden sein.

KESSLER und NICKERSON (1959) untersuchten die Zellwände von drei Stämmen C. albicans und zwei Stämmen S. cerevisiae. Nach Alkalibehandlung der gewaschenen und fettextrahierten Zellwände gewannen sie drei Fraktionen: den unlöslichen Rückstand mit 95 - 98 % Glucose und 2 - 5 % Mannan, den sie Glucanprotein nannten, ferner zwei alkalilösliche Fraktionen: Glucomannanprotein I

(nach Fällung mit $(NH_4)_2SO_4$) mit 48 - 54 % Glucose und 46 - 52% Mannose sowie Glucomannanprotein II (Überstand nach $(NH_4)_2SO_4$-Fällung) mit 29 - 37 % Glucose und 63 - 71 % Mannose nach Hydrolyse des Polysaccharidanteils. Der Gesamtstickstoff wird für das Glucanprotein mit 1,19 bis 1,39 %, für das Glucomannanprotein I mit 3,44 bis 4,07 % und für das Glucomannanprotein II mit 0,91 bis 0,97 % angegeben. Nach Ansicht von KESSLER und NICKERSON (1959) könnte es sich bei den drei Fraktionen um Protein-Polysaccharidkomplexe handeln, bei denen die Karboxylgruppen von Proteinen mit den Hydroxylgruppen der Polysaccharide verestert sind.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen SUMMERS, GROLLMAN und HASENCLEVER (1964). Nach Säurehydrolyse roher Zellwandextrakte (ß-Naphtol, Alkohol-Extraktion intakter Hefezellen) wiesen sie nur Mannose und Glucose im Verhältnis 2 : 1 und Gesamtstickstoff von 2,0 bis 3,5 % nach. Bei gereinigten Mannan-Extrakten, die serologische Aktivität besaßen, erhielten sie 95 % Mannose und 5 % Glucose; der Gesamtstickstoff betrug weniger als 0,1 - 0,5%. Diese chemischen Untersuchungen scheinen unsere Befunde, daß in der Zellwand nur Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene vorliegen, zu bestätigen. Nach den Befunden von SUMMERS et al. (1964), KEMP und SOLOTOROWSKY (1964) sowie unseren eigenen, noch unveröffentlichten dünnschichtchromatographischen Untersuchungen bestehen die serologisch aktiven Polysaccharide aus Mannose und Glucose.

Während die Zellwände bei Kaninchen Antikörper induzierten, blieben die Immunisierungsversuche mit den wäßrigen Phasen der Phenol-Wasser-Extraktion, obwohl sie in vitro serologisch aktiv waren, ergebnislos (MÜLLER, SIEGERT, PACHALY 1964). Zu gleichen Ergebnissen kamen KEMP und SOLOTOROWSKY (1964), wenn sie Tiere mit Extrakten nach Alkalibehandlung behandelten. SEELIGER (1958) erhielt ebenfalls keine Antikörper, wenn er die Kulturfiltrate von Sproßpilzarten Kaninchen injizierte, obgleich sie reichlich präzipitierende Substanzen enthielten.

Die Kohlenhydrate des Zellinhalts setzen sich hauptsächlich aus Hefeglykogen und Hefemannan zusammen. Daneben wurden Spuren

einer Methylpentose und Adenyl-Thiomethylpentose sowie Trehalose aus 2 Molekülen Glucose in α-,α-glucosidischer Bindung gefunden (SILBEREISEN 1960).

Das Hefeglykogen gilt als Reservestoff. Eine gut ernährte Hefe soll davon bis zu 20 % enthalten. Reines Hefeglykogen, ein amorphes weißes Pulver, löst sich etwa 20%ig in Wasser zu einer schwach opalisierenden Lösung; in Alkohol und Äther ist es unlöslich. Sein Molekulargewicht wird mit 2 bis über 10 Millionen angegeben. Einen weiteren Hauptanteil der Kohlenhydrate im Zellinhalt stellt, wie erwähnt, das Hefemannan. Ihm wird der Charakter eines Bauelementes zugesprochen. Nach Arbeiten von HAWORTH, LINDSTEDT und NORTHCOTE (zitiert bei SILBEREISEN 1960) ist das Hefemannan aus sehr verzweigten d-Manno-pyranose-Resten aufgebaut. Das Molekulargewicht wird mit etwa 100.000 angegeben. Der Aufbau ist heute noch nicht näher bekannt. Entsprechend den gewonnenen Methylierungsprodukten kommen 1,2-, 1,3- sowie 1,6-Bindungen vor. Die Säurehydrolyse führt nach HASHITANI (zit. bei SILBEREISEN 1960) zu viel Mannose und wenig Glucose. Das Mannan ist ausfällbar durch Fehlingsche Lösung, nicht aber mit Ammonsulfat. Von Takadiastase, Invertase und anderen Enzymen wird das Hefemannan nicht abgebaut. Sein Anteil beträgt zwischen 4 und 13,5 % der Trockensubstanz.

Serologische Untersuchungen sind bisher mit extrahierten Polysacchariden aus dem Zellinhalt noch nicht durchgeführt worden. Wir haben ihn deshalb der Phenol-Wasser-Extraktion nach WESTPHAL (1959) unterworfen. Die opalisierende, wäßrige Phase erwies sich als serologisch aktiv und zeigte die gleichen serologischen Spezifitäten wie die wäßrige Phase der Zellwände nach gleicher Behandlung. Im Gegensatz zur wäßrigen, klaren Zellwand-Phase führte jedoch die Agarelektrophorese des wäßrigen Zellinhalt-Phase zu Präparaten, die sich nicht nur mit PAS, sondern auch nach BEST anfärben ließen. Nach 1-stündiger Behandlung der Präparate mit Diastase (1%ig, 37°C) waren keine Best-positiven substanzen mehr nachweisbar. Die serologische Aktivität der Polysaccharide wurde jedoch durch Diastase-Einwirkung nicht beeinflußt.

Bei Behandlung der Phenol-extrahierten Inhaltstoffe mit Ammonsulfat entstand ein reichlicher Niederschlag, der, in Wasser gelöst, opalisierend war. Der Überstand blieb dagegen völlig klar. Beide Fraktionen zeigten in der Immunelektrophorese serologische Aktivität, der Überstand enthielt den Hauptteil der Antigene bzw. Haptene.

Die Opaleszenz der Lösung, die Anfärbung nach BEST, der Abbau durch Diastase und die Ausfällung mit Ammonsulfat sprechen dafür, daß durch die Phenol-Wasser-Behandlung außer dem serologisch aktiven Polysaccharid auch der Speicherstoff Glykogen aus den Hefen extrahiert wurde, das serologisch inaktiv ist.

Die serologisch aktiven Polysaccharide wurden durch Diastase nicht abgebaut, die meisten aktiven Polysaccharide ließen sich nicht mit Ammonsulfat, aber durch Fehlingsche Lösung fällen. Dies sind Kriterien, die für das Hefemannan angegeben werden. Somit dürften die meisten der serologisch aktiven Polysaccharide als Mannan anzusehen sein. Wie die durch Ammonsulfatbehandlung mitgefällten Haptene zu charakterisieren sind, bleibt weiteren chemischen Untersuchungen vorbehalten.

Der Eiweißanteil der Hefe macht rund 50 % des Trockengewichts aus. Zwei Proteine konnten bisher in den Hefen identifiziert werden: Das Cerevisin und das Zymocasein. Das Cerevisin stellt ein Albumin dar, das den Albuminen des Tier- und Pflanzenreiches gleicht. Es ist wasserlöslich, durch Hitze koagulierbar und kann mit Ammonsulfat ausgesalzen werden. Das Zymocasein fällt bei pH 4,5 als weiße käsige Masse aus, die sich nach und nach rötlich färbt. Es hat große Ähnlichkeit mit dem tierischen Casein. In 10%iger Kochsalzlösung ist es löslich und durch Hitze nicht koagulierbar.

Wir erhielten durch 50%ige Ammonsulfatsättigung ein gelbliches Präzipitat, das nicht in Wasser löslich war. Ein Teil löste sich aber in Kochsalzlösung. Der Hauptanteil war nur in NaOH löslich, ergab eine positive Biuretprobe, jedoch keine Hitzekoagulation. Es liegt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um das Zymocasein handelte. Bei weiterer Sättigung mit Ammonsulfat auf 90 % wurde ein weißer Niederschlag gefällt, der zum größten Teil in

Wasser löslich war, eine positive Biuretprobe gab und bei Erhitzen koagulierte. Nach der oben erwähnten Charakterisierung könnte es sich bei diesem Fällungsprodukt neben Glykogen um Cerevisine gehandelt haben.

III. Antigenschema der Sproßpilze

Die Ergebnisse von 264 Kreuzreaktionen mit Hilfe der Immunelektrophorese bestätigten die Befunde anderer Untersucher, daß zahlreiche Antigengemeinschaften zwischen den Hefen bestehen. Die von uns gefundenen Polysaccharid- bzw. Glykoproteidantigene stehen im allgemeinen in guter Übereinstimmung mit den von TSUCHIYA (1955 - 1965) gefundenen Zellwandantigenen. Geringfügige Diskrepanzen erklären sich zum Teil aus Schwankungen in der individuellen Antikörperbildung der Tiere oder auch aus antigenen Abweichungen der verwendeten Stämme. Es muß damit gerechnet werden, daß die verschiedenen Hefearten aus unterschiedlichen Serotypen bestehen. So fanden HASENCLEVER und MITCHELL (1961a-c) zwei Serotypen von C. albicans. TSUCHIYA (1965) und BIGUET (1965) widersprechen zwar dieser Vorstellung, jedoch konnten STALLYBRASS (1964a,b) und wir die beiden Typen A und B bestätigen. Wir fanden zudem noch einen dritten Serotyp C von C. albicans. Untersuchungen über die Verteilung dieser Typen sind noch nicht abgeschlossen (MÜLLER und KIRCHHOFF 1967).

Eine weitere Fehlermöglichkeit ist dadurch gegeben, daß die Präzipitation eine bestimmte Antikörperkonzentration zur Voraussetzung hat (SIEGERT, MÜLLER und PACHALY 1964). Man muß damit rechnen, daß der eine oder andere Antikörper in einem Immunseren diese Titerschwelle nicht erreicht. Die Folge wären weniger Präzipitationslinien als der Zahl der Antigene bzw. Antikörper entspricht. Diese Vorstellung wäre eine Erklärung dafür, daß z.B. das C.albicans-Serum mit C.robusta-Antigen zu mindestens drei Präzipitationslinien führte, während umgekehrt das C.robusta-Serum mit C.albicans-Antigen nur eine einzige Linie zeigte.

Die im Zellinhalt der Sproßpilze vorkommenden Eiweißantigene wurden von TSUCHIYA (1955 - 1965) nicht erfaßt. Wenn sie auch für die serologische Identifizierung der Hefen und für den An-

tikörpernachweis im Patientenserum keine Rolle spielen, halten wir ihre Berücksichtigung für die Klassifizierung der Sproßpilze jedoch für unerläßlich. Auch hinsichtlich der zur Anode wandernden Eiweißantigene des Zellinhalts bestehen Antigenverwandtschaften.

Eine Gesetzmäßigkeit im Antigenmuster einzelner Gattungen, sowohl der Eiweiß- als auch der Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene, ließ sich nicht erkennen. Diese Feststellung ist im Hinblick auf die Candida-Gruppe nicht verwunderlich, weil sie, wie schon erwähnt, aufgrund morphologischer Gesichtspunkte gegliedert wurde, die (Askosporenbildung) heute keine Gültigkeit mehr besitzen. Für die Gattungen Cryptococcus, Rhodotorula und Schizosaccharomyces läßt sich noch keine bindende Aussage machen, weil jeweils nur ein Vertreter untersucht wurde. Es ist jedoch auffallend, daß diese drei verschiedenen Gattungen mit den Immunseren gegen C. albicans, C. krusei, C. curvata, T.glabrata und T. dattila fast gleichsinnig reagierten. Dieser Befund spricht ebenfalls gegen ein typisches Antigenmuster der einzelnen Gattungen. Aber auch die Gattung Torulopsis, von der vier Arten untersucht wurden, besitzt keine einheitliche Antigenstruktur. Am ähnlichsten verhielten sich die beiden Saccharomycesarten untereinander, jedoch kann das zufällig durch die Auswahl der Arten bedingt sein. So zeigten ja auch C. albicans, C. tropicalis und C. stellatoidea fast gleichsinnige Reaktionen, ohne daß ihr Antigenmuster für die Candidagruppe typisch ist.

Wenn sich auch keine besonderen Antigenformeln für die einzelnen Sproßpilzgattungen aufstellen ließen, zeigten einige Sproßpilzarten eine deutliche Übereinstimmung hinsichtlich ihrer Eiweiß- und Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene. Nachfolgend wird eine entsprechende Gruppierung angegeben:

Gruppe A: C. albicans
C. tropicalis
C. stellatoidea
C. guilliermondii
C. parapsilosis
T. glabrata
T. dattila

Gruppe B: C. krusei
T. famata
S. rouxii
S. cerevisiae
C. robusta

Gruppe C: C. pseudotropicalis
C. macedoniensis
C. scottii

Die übrigen untersuchten Sproßpilze zeigten keine ausgesprochenen Antigengemeinschaften mit anderen Hefen. Am ehesten ließen sich noch C. lipolytica und C. brumptii miteinander vergleichen.

Auch TSUCHIYA (1965) erkannte die Antigenverwandtschaft zwischen C. albicans, C. tropicalis und C. stellatoidea mit T. glabrata, und faßte sie in einer Gruppe zusammen. Dagegen teilte er C. guilliermondii und C. parapsilosis jeweils verschiedenen Gruppen zu. Ihre enge Verwandtschaft ergab sich erst durch Einbeziehung der Eiweißantigene.

Übereinstimmend mit TSUCHIYA (1965) und BIGUET (1962) fanden wir ausgeprägte antigene Beziehungen zwischen C. pseudotropicalis und C. macedoniensis. Im Gegensatz zu TSUCHIYA halten wir aber S. rouxii, S. cerevisiae und C. robusta näher mit C. krusei als mit C. pseudotropicalis und C. macedoniensis verwandt. Auch diese Verwandtschaft wurde erst durch Nachweis der Eiweißantigene erkannt.

Wir haben deshalb die Eiweißantigene näher berücksichtigt. Wie in C IVd beschrieben, gelang es, einen Teil der Proteinantigene durch fraktionierte Ammonsulfatbehandlung zu isolieren. Unsere Untersuchungen mit Immunseren, die gegen den 90%igen Ammonsulfatniederschlag von fünf Candida-Arten gerichtet waren, führten erstmalig zum Nachweis von 13 verschiedenen Antigenen von Proteincharakter. Im Gegensatz zu den mit arabischen Zahlen bezeichneten Glykoproteinantigenen haben wir die Proteinantigene mit römischen Zahlen benannt. Die 13 Antigene verteilen sich wie folgt auf die untersuchten Sproßpilze:

C. albicans	I, II, III
C. tropicalis	I, IV, V, IX
C. stellatoidea	I, II
C. krusei	VI, VII, VIII
C. pseudotropicalis	IX, X
C. utilis	XI, XII, XIII
C. guilliermondii	IV
C. lipolytica	XI
C. parapsilosis	III
C. scottii	IX
C. macedoniensis	IX, X
T. glabrata	I, III, IX

Allerdings erhebt dieses Schema keinen Anspruch auf Vollständigkeit, weil wir nur die Proteine von vermutlich Cerevisincharakter erfaßt haben. Zusätzliche Antigene sind durch Einbeziehung weiterer Hefen zu erwarten, worauf die Kreuzreaktionen in C II hinweisen. Wir halten jedoch ihre Aufnahme in ein Schema wegen der unterschiedlichen Qualität der Immunseren noch nicht für gerechtfertigt.

IV. Praktische Bedeutung der Befunde

Die durch Phenol-Wasser-Behandlung extrahierten Polysaccharide stellen ein leicht zu gewinnendes, standardisierbares Antigengemisch dar. Da im menschlichen Körper die Infektionen durch intakte Hefezellen verursacht werden, sind bei Erkrankungen zunächst nur Antikörper gegen die Zellwandantigene zu erwarten. Somit eignen sich die von Eiweißen befreiten Polysaccharide besonders gut als Antigen für die Antikörpersuche bei mykotischen Erkrankungen. Die extrahierten Antigene sind sowohl für die Komplementbindungsreaktion und den Präzipitationstest als auch für den Hämagglutinationstest mit sensibilisierten Erythrozyten brauchbar. Der letztere gilt als die empfindlichste Reaktion zum Nachweis von Antikörpern. So fanden wir bei Immunseren von Kaninchen einen 4 - 8-mal höheren Titer mit dem Hämagglutinationstest als mit der Komplementbindungsreaktion (MÜLLER 1966). Noch eindrucksvoller waren die Ergebnisse bei menschlichen Erkrankungen mit C. albicans und C. tropicalis. Hier zeigte der

Hämagglutinationstest trotz häufig negativer oder niedriger Titer in der Komplementbindungsreaktion noch eindeutig pathologische Werte oder Titeranstiege (MÜLLER 1967).

Die Trennung der Polysaccharide durch Ammonsulfatbehandlung in zwei Fraktionen ermöglicht einige interessante Ausblicke. Während im Überstand die Hauptmenge der serologisch aktiven Polysaccharide enthalten ist, zeigte der Niederschlag höchstens zwei bis drei Polysaccharide. Bei Kreuzreaktionen der Niederschläge mit heterologen Seren entsteht der Eindruck, daß das für eine Art spezifische Antigen im Niederschlag enthalten ist. Das wird vor allem dann bedeutungsvoll, wenn es gelingt, Antikörper gegen diese Polysaccharide zu gewinnen. Man kann dann leichter zu monospezifischen Seren durch Absorption oder durch entsprechende Verdünnung gelangen, die für die von TSUCHIYA (1961) angestrebte serologische Differenzierung der Sproßpilze erforderlich sind.

Die Fraktionierung der Eiweißantigene durch Ammonsulfatfällung scheint uns - wie schon erwähnt - vor allem für die Klassifizierung der Sproßpilze bedeutungsvoll zu sein. Die Serologie wird möglicherweise durch Einbeziehung der in der Antigenstruktur enthaltenen Proteinantigene zu einer neuen Klassifizierung der Sproßpilze, vor allem der nicht mehr aufrechtzuerhaltenden Candida-Gruppe, beitragen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Die biochemischen Methoden zur Differenzierung der Sproßpilze sind zeitraubend und kostspielig. Deshalb wird eine serologische Differenzierung analog der Salmonellendiagnostik angestrebt. Voraussetzung für die systematische Klassifizierung der heterogenen Candidagruppe sowie für den Antikörpernachweis bei mykotischen Erkrankungen ist die Kenntnis der Antigenstruktur.

Alle bisherigen Autoren befaßten sich fast ausschließlich nur mit den Oberflächenantigenen der Sproßpilze. Die Untersuchungen wurden mit verschiedenen Verfahren durchgeführt und erbrachten deshalb abweichende Ergebnisse. Bei einem Vergleich der heute üblichen serologischen Methoden am Beispiel von C. albicans und C. tropicalis stellte sich heraus, daß viele Antigene nur mit der Immunelektrophorese erfaßt werden können.

Die Antigene konnten mit Hilfe dieser Methode, in Verbindung mit der Agarelektrophorese und Spezialfärbungen, erstmals durch Untersuchungen an getrenntem Zellmaterial lokalisiert werden. Danach sind im Zellinhalt Polysaccharid- bzw. Glykoprotein- und Proteinantigene enthalten, während die Zellwände nur Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene besitzen. Die Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene im Zellinhalt und in der Zellwand einer Hefe scheinen identisch zu sein.

Um einen Überblick über die antigenen Beziehungen der Sproßpilze untereinander zu erhalten, wurden die immunelektrophoretischen Untersuchungen auf 24 Sproßpilzarten ausgedehnt. Es handelte sich hauptsächlich um Candida-Arten, aber auch um einige Vertreter der Gattungen Saccharomyces und Torulopsis sowie um je einen Stamm der Gattungen Cryptococcus, Rhodotorula und Schizosaccharomyces.

Die von anderen Autoren gefundenen Verwandtschaften zwischen den Zellwandantigenen konnten im allgemeinen bestätigt werden. Neue Gesichtspunkte ergaben sich durch die erstmalige Einbeziehung der Zellinhaltantigene, also zusätzlicher Proteinantigene. Hiernach besitzen die Arten C. guilliermondii und C. parapsilosis eine auffallende Verwandtschaft zur C.albicans-Gruppe. Weiter konnten antigene Beziehungen zwischen S. rouxii, S. cerevisiae und C. robusta mit C. krusei aufgedeckt werden, während man sie früher C. pseudotropicalis zuordnete.

Typische Antigenmuster innerhalb der einzelnen Gattungen ließen sich bei der relativ kleinen Zahl der untersuchten Vertreter nicht erkennen. Eindeutig konnten jedoch antigene Verwandtschaften einiger Candida-Arten zu Arten anderer Sproßpilzgattungen nachgewiesen werden, wie z.B. C. albicans, C. tropicalis und C. stellatoidea zu T. glabrata und T. dattila, C. robusta zu S. cerevisiae und C. krusei zu T. famata.

Zum Nachweis feiner Antigendifferenzen, z.B. zwischen C. albicans und C. tropicalis, bewährte sich eine Kombination von Absorption und Immunelektrophorese. Die Bindung an sensibilisierte Blutkörperchen war der bisher üblichen Absorption mit intakten Hefezellen weit überlegen.

Die Gewinnung monospezifischer Immunseren wird erschwert, wenn man ein breites Antigengemisch, wie es Hefezellhomogenisate darstellen, verwendet. Deshalb wurde versucht, die Antigene einzeln oder in kleinen Gruppen zu isolieren.

Die Polysaccharide bzw. Glykoproteine ließen sich durch drei Verfahren, die qualitativ die gleiche Ausbeute erbrachten, sowohl aus dem Zellinhalt als auch aus den Zellwänden extrahieren. Versuche, diese extrahierten Polysaccharide bzw. Glykoproteine säulenchromatographisch an Sephadex aufzutrennen, führten lediglich zur Abtrennung eines einzigen Polysaccharids von Haptencharakter. Alle anderen, serologisch aktiven Polysaccharide erschienen zusammen mit dem Speicherstoff Glykogen im Ausschlußgipfel.

Eine Auftrennung der extrahierten Polysaccharide in zwei Fraktionen ließ sich durch Behandlung mit Ammonsulfat erreichen. Bei Kreuzreaktionen dieser Fraktionen aus 4 Candida-Arten mit heterologen Seren entstand der Eindruck, daß der Niederschlag die jeweils artspezifischen Antigene zusammen mit Glykogen und einem oder zwei weiteren aktiven Polysacchariden enthält. Diese Fraktionen besitzen möglicherweise Haptencharakter, weil sich eine Antikörperbildung weder durch i.v. Verabreichung noch mit Freundschem Adjuvans erreichen ließ.

Zur Gewinnung der Proteinantigene bot sich die bei Serumeiweißisolierung übliche fraktionierte Ammonsulfatbehandlung an. Hiermit wurden drei Fraktionen gewonnen, von denen zwei die Eiweiße enthielten, während die dritte den Hauptteil der serologisch aktiven Polysaccharide ausmachte.

Die erste, durch 50%ige Ammonsulfatsättigung des Zellinhalts gewonnene Fraktion bestand aus einer geringen Menge gelblichen Niederschlags, der wasser- und NaCl-unlöslich, aber löslich in Lauge war. Nach seinen chemischen Kriterien dürfte es sich hierbei um das Zymocasein der Hefen gehandelt haben. In vitro waren diese Proteine aber nicht mehr serologisch aktiv.

Die zweite, eiweißhaltige Fraktion wurde als reichlicher weißer Niederschlag bei 90%iger Sättigung mit Ammonsulfat erhalten. Er war in Wasser und NaCl-Lösung löslich und koagulierte bei Erhitzen. Es wird angenommen, daß es sich um die Cerevisine der Sproßpilze handelte. Mit Hilfe der Immunelektrophorese konnten in dieser Fraktion je nach Sproßpilzart, zwei bis vier Eiweißantigene dargestellt werden. Daneben ließen sich noch Spuren von Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigenen nachweisen.

Die Immunisierung von Kaninchen mit den durch 90%ige Ammonsulfatsättigung gewonnenen Niederschlägen aus fünf Candida-Arten führte zu Antiseren, mit denen erstmals dreizehn, in ihrer Spezifität unterschiedliche Proteinantigene nachgewiesen und in den untersuchten Sproßpilzen lokalisiert werden konnten. Damit war die Möglichkeit zur Vervollständigung der bisher nur für Zellwandantigene gültigen Antigenschemata gegeben.

F. LITERATUR

AKIBA, T., IWATA, K. and INOUE, S.: Studies on the serologic diagnosis of Candidiasis.
Studies on Candidiasis in Japan 65-77.
Research Commitee of Candidiasis, Education Ministry of Japan (1961)

BADER, G.: Die viszeralen Mykosen.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1965)

BAKERSPIEGEL, A.: Soil Extract Agar for Candida albicans.
Arch.Derm.Syph. 69, 735 (1954)

BERNHARDT, H.-L.: Die Pilzarten des Sputums.
Zbl.Bakt. I Orig. 178, 515-522 (1960)

BIGUET, J., TRAN VAN KY, P. et ANDRIEU, S.: Étude électrophoretique et immunochimique comperée des antigènes de quelques levures du genre Candida.
Mycopath. et mycol. appl. 17, 239-254 (1962)

BIGUET, J., TRAN VAN KY, P., ANDRIEU, S. et FRUIT, J.: Analyse immunoélectrophorétique des antigénes fongiques et systématique des champignons. Répercussions pratiques sur le diagnostic des mycoses.
Mycopath. et mycol. appl. 26, 241-256 (1965)

BOIVIN, A. et MESROBEANU, L.: Remarques concernant la technique d'extraction du complexe polysaccharidique antigénique renfermé dans le Bacille d'Aertrycke.
Compt. rend. soc. biol. 115, 304-310 (1934)

BÜRGER, H. und MÜLLER, H.-L.: Markierung von antigenen Hefepolysacchariden mit Vinylsulfonfarbstoffen.
Naturwissenschaften 51, 463 (1964)

CONN, N.K., CREAN, G.P., MACABE, A.F. and McLEAN, N.: Systematic Candidiasis and endocarditis due to C. tropicalis.
Brit.med.J. 1959 I, 944-947.

DROUHET, E. et VIEU, M.: Biologie des infectiones a Candida. Mycologie Médicale, 115-149, Paris 1956.

ELINOV, N.P. und ZAIKINA, N.A.: Präzipitationsreaktion bei der serologischen Diagnose der Moniliasis.
Z.mikrobiol. 30, 40-45 (1959)

FAHLBERG, W.J., DUKES, C.D., GUTHRIE, R.K.: Rapid classification of Candida albicans.
J.invest.Dermat. 29, 111-118 (1957)

GORDON, A.H., KEIL, B. and SEBESTA, K.: Electrophoresis of proteins in agar-jelly.
Nature 164, 498-499 (1949)

HASENCLEVER, H.F. and MITCHELL, W.O.: Antigenic studies of Candida. I. Observation of two antigenic groups in Candida albicans.
J.Bactériol. 82, 570-574 (1961)

HASENCLEVER, H.F., MITCHELL, W.O. and LOEWE, I.: Antigenic studies of Candida. II. Antigenic relationship of Candida albicans group A and group B to Candida stellatoidea and Candida tropicalis.
J.Bacteriol. 82, 574-577 (1961)

HASENCLEVER, H.F. and MITCHELL, W.O.: Antigenic studies of Candida. III. Comparative pathogenicity of Candida albicans group A, group B and Candida stellatoidea.
J.Bacteriol. 82, 578-581 (1961)

HASENCLEVER, H.F. and MITCHELL, W.O.: A study of yeast surface antigens by agglutination inhibition.
Sabourandia 3, 288-300 (1964)

JOACHIM, H. and POLAYES, S.H.: Subactute endocarditis and systemic mycosis.
J.Amer.med.Ass. 115, 205-208 (1940)

JONSEN, J.: Serological studies in genus Candida. Amanuensis at the norwegien state dental school, Oslo.
Akademisk Trykningssentral Blindern, Oslo 1955.

JULEY, L., WALCH, H.J. and BIRD, E.: Enriched Proline-Tween-Agar: A medium for identification of Candida.
Am.J.Clin.Path. 37, 664-666 (1962)

KAFFKA, A.: Tellurithaltige Serumnährmedien zur Differenzierung von Candida albicans.
Zbl.Bakt. I Orig. 165, 264-274 (1956)

KELLY, J.P. and FUNIGIELLO, F.: A study of media designed to promote Chlamydospore production.
J.Lab.u.Clin.Med. 53, 807-809 (1959)

KEMP, G. and SOLOTOROWSKY, M.: Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of the genera Candida and Torulopsis.
J.Immunol. 93/2, 305-314 (1964)

KESSLER, G. and NICKERSON, W.J.: Glucomannan-Protein Complexes from Cell Walls of Yeasts.
J.Biol.Chem. 234, 2281-2283 (1959)

KITAMURA, S.: Study on the preparation of the antigen for diagnostic intradermal reaction, obtained from Candida albicans on electric dissolution, 78-83.
Studies on Candidiasis in Japan. Research Commitee of Candidiasis, Education Ministry of Japan (1961)

KLOSE, F. und SCHÜRMANN, R.: Experimentelle Untersuchungen über Soormykose.
Z.Hyg. 134, 63-77 (1952)

KÖHLMEIER, W.: Zur Kenntnis der Candidainfektionen.
Klin.Med. 8, 54-61 (1953)

MARKOWITZ, A.S. and HENDERSON, J.S.: A rapid and specific method for the isolation of Pneumococcal polysaccharide.
Nature 181, 771-772 (1958)

MARTIN, D.S., JONES, C.P., YAO, K.F. und LEE, L.E.jr.: A practical classification of the Moniliasis. J.Bactertiol. 34, 99-123 (1937)

MARTIN, D.S.: Studies on the immunologic relationships among various species of the Candida (Monilia). Amer.J.Trop.Med. 22, 295-307 (1942)

MEHNERT, B.: Nachweis und Differenzierung pathogener Hefen im Untersuchungsmaterial von Mensch und Tier. Zbl.Bakt. I Orig. 184, 240-246 (1962)

MÜLLER, H.-L., SIEGERT, R. und PACHALY, D.: Zur Antigenstruktur von Candida albicans und tropicalis. 2. Mitteilung: Serologisches Verhalten von Zellmembran und Zellinhalt nach Phenol-Wasser-Extraktion. Zbl.Bakt. I Orig. 193, 117-122 (1964)

MÜLLER, H.-L. und BÜRGER, H.: Antigenanalyse von Candida albicans und C. tropicalis. Zbl.Bakt. I Orig. 198, 240-242 (1965)

MÜLLER, H.-L.: Vergleichende immunelektrophoretische Untersuchungen an Hefen. Vortrag zur Tagg. d. Mykol. Ges. in München (1965)

MÜLLER, H.-L.: Agar- und immunelektrophoretische Untersuchungen an Sproßpilzen. Vortrag zur Tagg. d. Mykol. Ges. in Wien (1966)

MÜLLER, H.-L.: Zur Antigenstruktur von Candida albicans und tropicalis. 3. Mitteilung: Nachweis von Antigendifferenzen zwischen beiden Hefen durch Absorption von Immunseren mit sensibilisierten Erythrozyten. Zbl.Bakt. I Orig. 200, 266-273 (1966)

MÜLLER, H.-L.: Der Hämagglutinationstest in der Candida-Serologie. Krankheiten durch Aktinomyceten und verwandte Erreger, 84-87. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

MÜLLER, H.-L. und HIRSCH, M.: Zur Antigenstruktur von Candida albicans und tropicalis. 4. Mitteilung: Immunelektrophoretische Antigenstudien an Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl.Bakt. I Orig. 202, 247-256 (1967)

MÜLLER, H.-L., SCHIFF, W. und KOEPPE, K.: Die Chlamydosporenbildung und ihre Verwendung zur Schnelldiagnostik der Sproßpilze.
Zbl.Bakt. I Orig. 203, 403-415 (1967)

MÜLLER, H.-L. und KRANENBERG, K.: Untersuchungen über Antigengemeinschaften zwischen hefeartigen Pilzen.
Mycopath. et Mycol. appl. (im Druck)

MÜLLER, H.-L. und STOLZENBACH, G.: Versuche zur Isolierung von Candida albicans-Antigenen.
Zbl.Bakt. I Orig. (im Druck)

MÜLLER, H.-L. und KIRCHHOFF, G.: Serologische Typen von Candida albicans.
Zbl.Bakt. I Orig. (in Vorbereitung)

NEGRONI, D.: zit. nach AKIBA, T.

NIEL, K.: Zur Klinik der Candidainfektionen.
Klin. Med. 8, 49-54 (1953)

NICKERSON, W. et MANKOWSKI, Z.: A polysaccharid medium of known composition favoring chlamydospore formation in C. albicans.
J.Infect.Dis. 92, 20-25 (1953)

OTTO, R.: Experimentelle Untersuchungen über die Streptokokkenpräzipitation im Agar-Gel.
Zbl.Bakt. I Orig. 177, 546-552 (1960)

PASTERNACK, J.G.: Subacute monilia endocarditis, a new clinical and pathologic entity.
Amer.J.clin.Path. 12, 496-505 (1942)

PAVLATOU, M. et MARCELOU, U.: Milieu favorisant la formation des chlamydospores de Candida albicans.
Ann.Inst.Pasteur 91, 410-413 (1956)

PERSELLIN, R.H., HARING, O.M. and LEWIS, F.J.: Fungal endocarditis following cardiae surgery.
Ann.intern.Med. 54, 127-134 (1961)

POLEMANN, G.: Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten.
Thieme-Verlag, Stuttgart (1961)

POSPISIL, L.: Zur Serologie der mykotischen Erkrankungen.
I. Komplementbindungsreaktion bei Moniliasis.
Zbl.Bakt. I Orig. 161, 311-314 (1954)

POSPISIL, L.: Agglutinations-, Komplementbindungs- und Hämagglutinationsreaktion bei der Bestimmung von Candida-Arten.
Dermatologica 118, 65-73 (1959)

ROBINSON: zit. bei: GÖTZ, H.: I. Dermatologisches Übersichtsreferat 1955.
Münch.Med.Wschr. 97, 214-216 (1955)

RÖTTER, W. und STAIB, F.: Candida tropicalis-Pneumonie.
Dtsch.Med.Wschr. 1958, 2285-2288.

SCHABINSKY, G.: Grundriss der Medizinischen Mykologie.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena(1960)

SCHEIDEGGER, J.J.: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorese.
Internat.Arch.Allergy 7, 103-110 (1955)

SCHOLER, H.J., GLOOR, F. und DETTLI, L.: "Endocarditis durch Candida parapsilosis".
In GRIMMER und RIETH: Hefepilz als Krankheitserreger bei Mensch und Tier, 78-85.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1963)

SEELIGER, H.P.R.: Zur Anwendungsmöglichkeit der Präzipitation im Agar-Gel bei der O-Antigenanalyse von Bakterien und Pilzen.
Zschr.Hygiene 141, 110-121 (1955)

SEELIGER, H.P.R.: Serodiagnostik der Pilze und mykotische Infektionen.
Zbl.Bakt. I Orig. 184, 203-226 (1962)

SIEGERT, R., MÜLLER, H.-L. und PACHALY, D.: Zur Antigenstruktur von Candida albicans und tropicalis. 1. Mitteilung: Antigene Eigenschaften von Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl.Bakt. I Orig. 191, 533-542 (1964)

SILBEREISEN, K.: Die Hefen. Band I: Die Hefen in der Wissenschaft. B1III Kohlenhydrate, 353-368.
Verlag Hans Carl, Nürnberg (1960)

SIMONS, R.D.G.Ph.: Medical Mycology.
G.J. Thieme N.V., Nijmegen (1954)

SKOBEL, P., JORKE, D. und SCHABINSKI, G.: Akute generalisierte Mykose. Sepsis durch Candida pseudotropicalis.
Münch.Med.Wschr. 97, 194-197 (1955)

STAIB, F. und ATA, S.: Die Bedeutung der Kahmhefe Candida krusei (A.Castellani)-Berkhout beim Menschen.
Zbl.Bakt. I Orig. 169, 275-287 (1957)

STAIB, F. und BRAUN, H.: Candida tropicalis bei pathologischen Lungenbefunden.
Dtsch.Med.Wschr. 1961, 940-944.

STALLYBRASS, F.C.: The incidence of the serological groups of Candida albicans in southern England.
J.Hyg.Camb. 62, 395-398 (1964)

STALLYBRASS, F.C.: Candida precipitins.
J.Path.Bact. 87, 89-97 (1964)

SUMMERS, D.F., GROLLMAN, A.P. and HASENCLEVER, H.F.: Polysaccharide antigens of Candida cell walls.
J.Immunol. 92, 491-499 (1964)

TANNER, F.W., LAMPERT, E.N. und LAMPERT, M.: On the presence of yeast like fungi in normal threats.
Zbl.Bakt. I Orig. 103, 94-97 (1927)

THJØTTA, Th., JONSON, J. and RASCH, S.: Antigen studies in fungi.
Act.path.microbiol.Scand.Suppl. XCIII,367-374 (1952)

TODD, R.L.: Studies on yeast-like organisms isolated from the mouth and throuts of normal persons.
Amer.J.Hyg. 25, 212-220 (1937)

TOMCSIK, J.: Über die Rolle des Hefegummis in der serologischen Differenzierung einzelner Hefearten.
Zschr.Immunit.forschg. 66, 8-16 (1930)

TOMSIKOVA, A. und WAGNER, V.: Inkomplette Antikörper der Candida-Gruppe.
Immunit.forsch. 116, 239-245 (1949)

TSUCHIYA, T., MIYASAKI, F. und FUKAZAWA, Y.: Studies on the classification of the genus Candida.
II. Comparison of antigenic structures of standard and other strains.
Jap.J.Exp.Med. 25, 15-21 (1955)

TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y., MIYASAKI, F. und KAWAKITA, S.: Studies on che classification of the genus candida.
III. Thermostable and thermolabile antigens of the seven species of the genus Candida.
Jap.J.Exp.Med. 25, 75-83 (1955)

TSUCHIYA, F., FUKAZAWA, Y. and KAWAKITA, S.: A method for the rapid identification of the genus Candida.
Mycopath. et mycol. apll. 10, 190 (1959)

TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y. and KAWAKITA, S.: Serological classification of the genus Candida.
Studies on Candidiasis in Japan, 34-36.
Research Commitee of Candidiasis, Education Ministry of Japan (1961)

TSUCHIYA, T., FUKAZAWA, Y. and KAWAKITA, S.: Significance of serological studies on yeasts.
Mycopath. et mycol. appl. 26, 1-15 (1965)

URIEL, J. et SCHEIDEGGER, J.J.: Electrophorèse en gélose et coloration des constituants.
Bull.Soc.chim.biol. 37, 165-168 (1955)

WELD, J.T.: Candida albicans. Rapid identification in pure cultures with carbon dioxideon modified Eosin-Methylene-Blue medium.
Arch.Derm.Syph. 66, 691-694 (1952)

WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. und BISTER, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Zschr.Naturforsch. 76, 148-155 (1952)

WIKLER, A., WILLIAMS, E.G., DOUGLASS, E.D., EMMONS, C.W. and DUNN, R.C.: Mycotic endocarditis: report of case.
J.Amer.med.Ass. 119, 333-336 (1942)

WINDISCH, S. und STAIB, F.: Über das Vorkommen von Hefen im Darmtrakt. I. Mitteilung.
Zbl.Bakt. I Orig. 164, 493-507 (1955)

WINDISCH, S.: Die Hefen; Band 1: Die Hefen in der Wissenschaft.
A1 IV B: Die hefeähnlichen Pilze, 145-147.
Verlag Hans Carl, Nürnberg (1960)

WOLF, E.J. and HENDERSON, F.W.: Mykotic endocarditis, report of case.
J.Amer.med.Ass. 147, 1344-1347 (1951)

ZIMMERMANN, L.E.: Candida and aspergillus endocarditis.
Arch.Path. 50, 591-605 (1950)